

Aus der Frauenklinik und Poliklinik Charlottenburg
Klinikum Charlottenburg, Freie Universität Berlin
(Geschäftsf. Dir. Prof. Dr. G. Kindermann)
Abteilung für gynäkologische Endokrinologie
(Abteilungsleiter Prof. Dr. J. Nevinny-Stickel)

NUKLEARE SEXUALSTEROID-REZEPTOREN WÄHREND DES
MENSUELLEN ZYKLUS

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Thomas Scheiber
Bremen

1983





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546605_0025

Aus der Frauenklinik und Poliklinik Charlottenburg
Klinikum Charlottenburg, Freie Universität Berlin
(Geschäftsf. Dir. Prof. Dr. G. Kindermann)
Abteilung für gynäkologische Endokrinologie
(Abteilungsrl. Prof. Dr. J. Nevinny-Stickel)

NUKLEARE SEXUALSTEROID-REZEPTOREN WÄHREND DES
MENSUELLEN ZYKLUS

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Thomas Scheiber
Bremen

Referent: Priv. Doz. Dr. M. Schmidt-Gollwitzer

Korreferent: Prof. Dr. F. Neumann

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen fakultäten
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 9.8.1983

INHALT

	Seite
1. Einleitung	1
Eigene Fragestellung	3
2. Methodik	3
Trivialnamen und Abkürzungen	3
Material	3
Steroide	3
Radioaktiv-markierte Steroide	4
Puffer	4
Gewebe	4
Nuklear-Rezeptor-Bestimmung	6
Vorversuche	6
Steigende Menge Nuklearsuspension	6
Steigende Mengen radioaktiv markiertes Östradiol bzw. Promegeston	6
Zeitstudie	7
Austauschstudie	7
Verdrängungsstudie	7
Ermittlung der Dissoziationskonstanten (Kd)	8
Östradiol-Nuklear-Rezeptor	8
Progesteron-Nuklear-Rezeptor	9
DNS-Bestimmung	10
Material	10
Methode	10
Berechnung des Rezeptorgehalts	10
3. Ergebnisse	11
Ergebnisse der Vorstudien	11
Östradiol-Nuklear-Rezeptor	11
Steigende Menge Nuklearsuspension	11
Steigende Konzentrationen von (3H)-Östradiol	12
Zeitstudie	13
Kombinierte Zeit- und Temperaturstudie	14
Austauschstudie	15
Austauschstudie mit Vorabsättigung	16
Scatchard-Analyse	18
Progesteron-Nuklear-Rezeptor	19
Steigende Menge Nuklearsuspension	19

Steigende Menge (3H)-Promegeston	20
Zeitstudie	21
Kombinierte Zeit- und Temperaturstudie	21
Austauschstudie	22
Austausch bei Vorabsättigung	23
Scatchard-Analyse	25
Zusammenfassung der methodischen Ergebnisse	25
Östradiol- und Progesteron-Nuklear-Rezeptoren	
während des mensuellen Zyklus	26
Östradiol-Nuklear-Rezeptor	27
Progesteron-Nuklear-Rezeptor	28
4. Diskussion	30
Theoretische Vorstudien Östradiol-Nuklear-	
Rezeptor	30
Theoretische Vorstudien Progesteron-Nuklear-	
Rezeptor	31
Methodische Schwierigkeiten	31
Östradiol- und Progesteron-Nuklear-Rezeptoren	32
5. Zusammenfassung	35
6. Bibliographie	38

1. EINLEITUNG

Die Entdeckung der Steroid-Hormon-Rezeptoren durch Jensen et al. und Glascock et al. (40, 59) erweiterte die Kenntnisse über den Wirkungsmechanismus der Hormone in der Zelle. Das Konzept der spezifischen Reaktion der Steroidhormone über einen 'Hormon-Rezeptor-Mechanismus' am Genom konnte durch vielfältige Experimente bestätigt werden. So gelang es, biochemische Veränderungen in der zyklusabhängigen Regulation des Human-Endometrium zu charakterisieren.

Der endometriale Zyklus, erstmals 1908 von Hitschmann und Adler beschrieben (47), steht in direkter Abhängigkeit von der ovariellen Hormonbildung und übergeordneter endokrin-aktiver Drüsen (Hypophyse) sowie hypothalamischer Areale (Gonadotropin-Releasing-Hormon). Fränkel, Meyer und Schröder konnten die Beziehung zwischen Ovarialfunktion und Strukturwandel des Endometriums weiter klären (37, 79, 110, 111, 112, 113). Dies führte zur Entwicklung der Zykluslehre (78, 114).

Durch die Strukturaufklärung der Sexualsteroiden (15, 16, 27) und die Entwicklung geeigneter analytischer Verfahren zum Nachweis derselben (1, 3, 12, 60, 135) war es möglich, den endometrialen Zyklus mit der zyklusabhängigen Hormonbildung der Ovarien kausal zu verbinden. Die Entdeckung übergeordneter endokrin-aktiver Drüsen (Adenohypophyse, 4, 49) und hormonproduzierender hypothalamischer Areale (44, 105, 106) führte zur Entwicklung eines kybernetischen Regelkreises, dessen einzelne Glieder durch positive und negative Rückkopplung miteinander verbunden sind. Die Ovarialfunktion stellt die Regelgröße dar, die wiederum auf den Funktionszustand des Uterus einwirkt (11, 25, 69, 108, 133). Der genaue Mechanismus, über den die Sexualsteroiden in den Erfolgsorganen die zellspezifischen steroidhormon-abhängigen biochemischen Reaktionen auslösen, blieb unklar. Erst die Möglichkeit, Hormone durch die Einführung radioaktiver Isotope kenntlich zu machen, schaffte die Voraussetzung zur Aufklärung der Hormonwirkung.

Fürhlich hatte schon 1909 allgemein die Existenz spezifischer Rezeptoren für die Wirkung einer Substanz auf die Zelle postuliert (29). Jensen und Jacobsen zeigten 1962, daß Tritiummarkiertes Östradiol in den Erfolgsorganen (Tuben, Uterus, Vagina) selektiv angereichert wird (42, 59). Toft und Gorski isolierten erstmals aus dem Cytosol des Ratten-uterus einen spezifischen Rezeptor für Östradiol (122).

In vivo Injektionen von markierten Östradiol (83, 62, 13, 23) zeigten eine Anreicherung im Cytoplasma und im Kern, was auch für das Progesteron gezeigt werden konnte (18, 34). Der Rezeptor ließ sich als spezifisches, hochaffines und mit

begrenzter Kapazität bindendes Protein charakterisieren (14, 20, 55, 58, 123). Die Bindung des Hormon-Rezeptorkomplexes an den Kern und Chromatinabschnitte konnte nachgewiesen werden (48, 70, 71, 91, 118, 120). Via Hormon-Rezeptor-Mechanismus wird die Proteinbiosynthese beeinflusst (2, 43, 68, 88). Die Charakterisierung des cytoplasmatischen Rezeptors für Östradiol (115, 116) und Progesteron (109, 117) sowie die Identifizierung der Nuklear-Rezeptoren (Östradiol (95), Progesteron (87, 118, 119)) ist teilweise gelungen. Die Abbildung 1 zeigt zusammenfassend die Erkenntnisse über den Hormon-Rezeptor-Mechanismus nach den Angaben von O'Malley (20, 86).

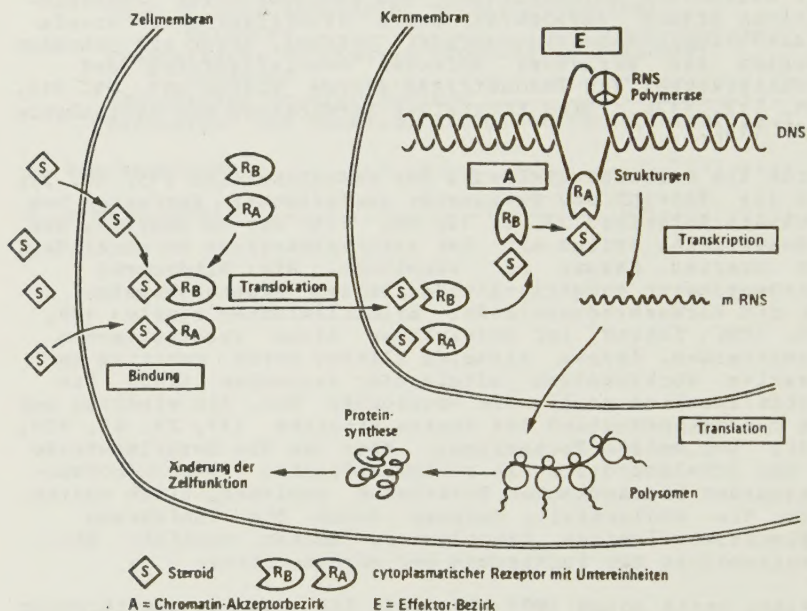


Abb. 1: Hormon-Rezeptor-Mechanismus

Untersuchungen an Meerschweinchen und an der Ratte zeigten zyklusabhängige Schwankungen des Gehalts an Rezeptoren für Östradiol und Progesteron in den uterinen Geweben (34, 35, 53, 75, 80, 81). Im Human-Myometrium und Endometrium ließen sich Rezeptoren für Östradiol und Progesteron nachweisen (13, 30, 33, 31, 46, 64, 32, 24, 45, 55, 65, 84, 77, 73,

96, 89, 92, 100, 101, 129, 126, 124, 136, 137). Außerdem konnten zyklusabhängige Konzentrationsänderungen im Rezeptorgehalt der Gewebe festgestellt (7, 8, 24, 45, 73, 91, 96, 100, 99, 124, 131, 134) festgestellt werden. Diese Untersuchungen wurden größtenteils nur für den Cytosol-Rezeptor durchgeführt. Über die Variabilität der Nuklear-Rezeptoren für Östradiol und Progesteron liegen nur wenige Angaben vor (2, 6, 8, 7, 63, 90, 102, 134).

1.1 EIGENE FRAGESTELLUNG

Durch diese Arbeit sollten die bereits in unserer Arbeitsgruppe vorliegenden Ergebnisse der Korrelation cytoplasmatischer Rezeptoren mit den Gewebespiegeln der Steroidhormone im Endometrium erweitert werden. Ziel der Arbeit war es daher:

1. Eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Nuklear-Rezeptoren für Östradiol und Progesteron zu erarbeiten.
2. Den Gehalts an Nuklear-Rezeptoren (Östradiol und Progesteron) im Human-Endometrium zu bestimmen.

2. METHODIK

2.1 TRIVIALNAMEN UND ABBEÜRZUNGEN

Östradiol = 1,3,5,(10)-Östradien-3,17 β -diol
Progesteron = 4-Pregnen-3,20-dion
R 5020 = 17,21-Dimethyl-19-Nor-4,9-Pregnan-3,20-dion
DNS = Desoxyribonukleinsäure
cpm = Zählrate pro Minute
SA = Spezifische Radioaktivität
Rn = Nuklear-Rezeptor
Rc = Cytosol-Rezeptor

2.2 MATERIAL

2.2.1 Steroide

Nicht radioaktiv markierte Steroide wurden in hochgereinigter Form von der Firma Schering AG Berlin/Berghagen zur Verfügung gestellt und in Ethanol in entsprechender Verdünnung gelöst. Zur Herstellung der

gebräuchlichsten Verdünnungen wurde das Ethanol durch Stickstoff abgedampft, und der Rückstand anschließend in Puffer aufgenommen.

2.2.1.1 Radioaktiv-markierte Steroide

Oestradiol (2,4,6,7-3H), (SA 135 Ci/mMol) und Promegeston R 5020 (17-alpha-methyl-3H), (Sa 87 Ci/mMol) wurden von New England Nuclear, Boston, Mass., USA, bezogen. Der Reinheitsgrad betrug stets mehr als 98%, was dünnschichtchromatografisch kontrolliert wurde.

2.2.2 Puffer

Es wurden vier Puffer verwendet:

PUFFER A. 1 mM MgCl₂ (Merck, Darmstadt), 1 mM Dithioerythritol (Sigma, St.Louis,USA), 0,01% sodium Azide (Merck), 250 mM Saccharose (Merck), 20 mM Tris-Hcl (Merck). Der Puffer wurde auf einen pH-Wert von 7,8 eingestellt.

PUFFER B. 1 mM MgCl₂ (Merck), 3 mM CaCl₂ (Merck), 10 mM KCl (Merck), 1 mM Dithioerythritol (Sigma), 0,01% sodium Azide (Merck), 250 mM Saccharose (Merck), 20 mM Tris-Hcl (Merck). Der pH-Wert wurde auf 7,8 eingestellt.

PUFFER C. 1 mM MgCl₂ (Merck), 3 mM CaCl₂ (Merck), 10 mM KCl (Merck), 1 mM Dithioerythritol (Sigma), 0,01% sodium Azide (Merck), 250 mM Saccharose (Merck), 20 mM Tris-Hcl (Merck) und 30% Glycerin (Merck). Der pH-Wert betrug 7,8.

PUFFER D. Der Puffer D entsprach dem Puffer C, wurde jedoch zusätzlich mit 7% Ethanol (Merck) und 1% Triton-x-100 (Serva, Heidelberg) versetzt.

2.3 GEBEWEE

Die untersuchten Endometrien wurden unmittelbar nach einer medizinisch indizierten Hysterektomie durch Ausschabung des Uterus gewonnen. Die Endometrien wurden sofort unter Eiskühlung in das Labor gebracht und dort sofort aufgearbeitet. War dies nicht möglich, wurden die Gewebeproben bei -30 C eingefroren und aufbewahrt. Alle untersuchten Patientinnen wurden anhand ihrer Zyklusanamnese und der histologischen Diagnose einem der unten aufgeführten Zyklusabschnitte zugeordnet. Die feingewebliche Datierung erfolgte nach der Methode nach

Noyes et al. auf der Basis eines 28-tägigen Zyklus (85). Um für die Auswertung genügend große Gruppen zu erhalten und eine Vergleichbarkeit zu anderen Untersuchern herzustellen, wurden die einzelnen Datierungen zu einzelnen Zyklusabschnitten zusammengefaßt (Tab. 1).

Tab. 1.

Zyklusdatierung

ZYKLUSTAGE	ZYKLUSABSCHNITT
1 - 10	Frühe proliferative Phase
11 - 15	Späte proliferative Phase
16 - 21	Frühe sekretorische Phase
22 - 28	Späte sekretorische Phase

Für die Untersuchung wurden nur Endometrien verwendet, die sich aufgrund der histologischen Datierung und der Zyklusanamnese eindeutig zuordnen ließen, und bei denen keine endokrinologische oder sonstige Erkrankung vorlag, die einen Einfluß auf den zyklusgerechten Aufbau des Endometrium hat.

GEWEBEAUFBEREITUNG.

Alle Schritte der Aufbereitung des Gewebes wurden im Eisbad durchgeführt. Das Endometrium wurde zunächst dreimal mit eiskühler 0,9 M NaCl-Lösung gewaschen und vom Blut befreit, mit Fließpapier die Flüssigkeit entfernt, und das Naßgewicht festgestellt. Mit einem Skalpell wurde das Gewebe zerkleinert und unter Zusatz von 5 ml gekühlten Puffer A pro 500 mg Naßgewicht in einem Potter-Elvehem Homogenisator (Pa. Braun-Melsungen) mittels vier kurzen Schüben homogenisiert. Die einzelnen Schübe (15 sec.) wurden jeweils von einem Kühlintervall (1 min.) unterbrochen. Das Homogenat ist anschließend durch eine vierfache Gazelage filtriert worden, und das Filtrat in einem Druckbehälter mit Stickstoff bei einem Druck von 1000 psi innerhalb von 30 min. abgesättigt worden. Durch die sich anschließende schnelle Dekompression konnten die Zellen aufgebrochen werden. Das so behandelte Filtrat ist dann einer fraktionierten Zentrifugation unterworfen worden, um die einzelnen Zellbestandteile voneinander zu trennen.

Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 850 x g in einer Laborkühlzentrifuge (Sorvall RC2 Kühlzentrifuge, Rotor SS 34) wurde das Sediment nach Abgießen des Überstandes zweimal mit Puffer B gewaschen und danach in 1,5 ml Puffer B aufgenommen. Die so gewonnene Nuklearsuspension wurde zur Bestimmung der spezifischen Rezeptoren für Östradiol und Progesteron verwandt.

Zur Gewinnung der Cytosolfraktion ist der Überstand für 15 min bei 12000 x g zentrifugiert worden (Sorvall RC 2 Kühlzentrifuge, Rotor SS 34). Der Niederschlag enthält die Mitochondrienfraktion. Zur Sedimentation der Mikrosomenfraktion ist der Überstand der 12000 x g Zentrifugation in einer Ultrazentrifuge (L 2-65 Pa. Beckman, Rotoren Ti 30 bzw. 50) für 90 min bei 105000 x g zentrifugiert worden. Der Überstand enthält die Cytoplasmafraktion.

2.4 NUKLEAR-REZEPTOR-BESTIMMUNG

2.4.1 Vorversuche

Um die Konditionen festzulegen, unter denen die Bestimmung der Nuklear-Rezeptoren durchgeführt werden kann, wurden Vorstudien durchgeführt. Es sollte geklärt werden, bei welchen Temperaturen, Inkubationszeiten und Konzentrationen radioaktiv markierter Steroidhormone eine hohe Bindung des markierten Hormons an die spezifischen Rezeptoren erreicht werden kann.

2.4.1.1 Steigende Menge Nuklearsuspension

Es wurden steigende Mengen Nuklearsuspension (25, 50, 100, 200 μ l) mit der entsprechenden Menge ($3H$)-Östradiol (10 nMol pro 100 μ l Nuklearsuspension) bei 4 °C über 24 Stunden inkubiert. Dabei wurden zur einen Hälfte jeweils ein 1000-facher Überschuss nicht markiertes Östradiol zugegeben. Aus der Differenz zwischen Totaler Bindung (ohne nicht markiertes Östradiol) und der unspezifischen Bindung (in Anwesenheit eines 1000-fachen Überschusses) ergibt sich die spezifische Bindung.

2.4.1.2 Steigende Mengen radioaktiv markiertes Östradiol bzw. Progesteron

Jeweils 100 μ l Nuklearsuspension wurden mit steigender Menge markierten Hormons (entsprechend 5 nMol bis 30 nMol) in Anwesenheit bzw. Abwesenheit eines 1000-fachen Überschusses nicht markierten Hormons inkubiert. Die Inkubationsdauer

betrug 24 Stunden bei 4 C. Aus der Differenz zwischen totaler und unspezifischer Bindung ergab sich die spezifische Bindung. Die Trennung von nicht an den Rezeptor gebundenen Hormon vom gebundenen Hormon erfolgte nach dem bei der Bestimmung des Östradiol-Nuklear-Rezeptor beschriebenen Verfahren.

2.4.1.3 Zeitstudie

Zur Ermittlung des Einflusses, den die Inkubationszeit auf die Bindung des markierten Steroidhormons an den Rezeptor hat, wurde die folgende Studie durchgeführt. Es wurden 100 µl Nuklearsuspension mit 10 nMol (3H)-Östradiol bzw. (3H)-Promegeston unterschiedlich lange und bei drei verschiedenen Temperaturstufen inkubiert. Gleichzeitig wurden Nuklearsuspensionsproben unter den gleichen Bedingungen in Anwesenheit eines 1000-fachen Überschusses von nicht markierten Hormon inkubiert, um so aus der Differenz die spezifische Bindung zu errechnen.

2.4.1.4 Austauschstudie

In dieser Studie sollte untersucht werden, inwieweit sich an den Rezeptor gebundenes Östradiol bzw. Promegeston durch nicht markiertes Hormon vom Rezeptor verdrängen läßt. Dazu wurden 100 µl Nuklearsuspension mit 10 nMol (3H)-Östradiol über 24 Stunden bei 4 C Inkubationstemperatur inkubiert. Anschließend wurde zum einen Teil ein 1000-facher Überschuss nicht markierten Östradiols zugegeben, zum anderen 100 µl Puffer C, um in beiden Teilen die gleiche Konzentration von markiertem Östradiol aufrechtzuerhalten. Die Reaktion wurde nach der angegebenen Zeit gestopt, und die resultierende Aktivität gemessen.

2.4.1.5 Verdrängungsstudie

Hierdurch sollte geklärt werden, ob mit dieser Methode sowohl die freien Nuklear-Rezeptoren als auch die mit endogenem Hormon besetzten Rezeptoren erfaßt werden. Dazu wurde die Nuklearsuspension (100 µl) mit 10 pMol Östradiol bzw. Progesteron für 24 Stunden bei 4 C inkubiert, um alle Rezeptoren mit Hormon zu besetzen. Das nicht an Rezeptoren gebundene Hormon wurde durch dreimaliges Waschen, gefolgt von einer jeweiligen Zentrifugation, entfernt. Anschließend wurde der zu ermittelnde Rezeptorgehalt in dieser 'vorabgesättigten' Nuklearsuspension bestimmt.

Es wurden 10 nMol markiertes Steroidhormon verwandt, wobei sowohl die Inkubationszeit als auch die Inkubationstemperatur verändert wurden, um festzustellen, welchen Einfluß diese Variablen auf den Hormonaustausch haben. Zum Vergleich wurde ein vor der 'Vorabsättigung' mit 10 pMol nicht markiertes Hormon bestimmter Rezeptorgehalt herangezogen, der bei 4 C und über 24 Stunden ermittelt wurde.

2.4.1.6 Ermittlung der Dissoziationskonstanten (Kd)

Die Dissoziationskonstante sowie die Konzentration von in der Nuklearsuspension enthaltenen Rezeptoren wurde an einigen Geweben untersucht. Dazu wurden 100 ul Nuklearsuspension mit steigenden Konzentrationen (3H)-Östradiol bzw. (3H)-Progesteron (1,25 - 10 nMol) inkubiert. Die Werte wurden jeweils um die unspezifische Bindung korrigiert. Die Auswertung erfolgte durch grafische Ermittlung mit Hilfe der Scatchard-Analyse (104).

Aus diesen Voruntersuchungen ergaben sich dann die Konditionen, unter denen ein möglichst hoher Bindungsgrad des markierten Hormons an den Rezeptor zu erreichen war, wie sie im nachfolgend beschriebenen Standard-Assay verwandt wurden.

2.4.2 Östradiol-Nuklear-Rezeptor

Zur Bestimmung der Rezeptoren wurden nur vorgekühlte Substanzen verwendet, und alle Schritte bei 4 C im Eisbad ausgeführt.

Es wurde ein nach Bayard et al. modifiziertes Verfahren angewandt (8). Die verwendete Totalkapazität, die Totalbindung des radioaktiv markierten Östradiols und die Bindung des tritierten Östradiols in Anwesenheit eines 1000-fachen Überschusses von nicht-markiertem Hormon zur Ermittlung der unspezifischen Bindung wurden jeweils im Doppelansatz ermittelt.

Jeweils 100 ul Nuklearsuspension wurden mit 100 ul 30 nMol (3H)-Östradiol und entweder mit 100 ul Puffer C zur Bestimmung der totalen Bindung oder mit einem 1000-fachen Überschuss von nicht markiertem Östradiol zur Ermittlung der spezifischen Bindung versetzt. Es ergab sich somit eine Endkonzentration von 10 nMol (3H)-Östradiol im Reaktionsansatz von 300 ul. Die Inkubation erfolgte bei 4 C im Eisbad und erstreckte sich über 24 Stunden, wobei durch einen Rüttler für ständige Durchmischung des Reaktionsansatzes gesorgt wurde. In der Tabelle 2 sind die einzelnen Pipettierschritte dargestellt.

Tab. 2.

Pipettierschema

	NUKLEAR SUSPENSION ul	TRITIERTES HORMON pMol/100 ul	UNMARKIERTES HORMON pMol/100 ul	PUFFER C ul
TOTAL AKTIVITÄT	---	30	---	---
TOTAL BINDUNG	100	30	---	100
UNSPECIFISCHE BINDUNG	100	30	3000	100

Der Reaktionsstop erfolgte durch Hinzugabe von 1 ml Puffer D. Die Inkubationsröhrchen wurden dann für 15 min bei 850 x g zentrifugiert (Sorvall RC2 Kälzentrifuge, Rotor SS 34), der Überstand verworfen, und das Sediment, das das an den Rezeptor gebundene markierte Hormon enthält, noch zweimal mit 1,5 ml Puffer D gewaschen und jeweils zentrifugiert. Dem letzten Rückstand wurden 0,2 ml Solven (Packard) zugesetzt. Nach 24 Stunden wurden 0,4 ml Ethanol (Merck) hinzugefügt, das ganze sorgfältig mit einem Whirler (Cento Instrumenten bv Breda, Niederlande) vermischt und davon 0,5 ml in ein Packard-Töpfchen pipettiert. Sämtliche Proben wurden mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Inst-Gel Packard) versetzt, und in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Isocap 300) die Radioaktivität in cpm ermittelt. Die Effizienz lag bei ca. 34%, wobei der Fehler nach der Zählstatistik unter 2% lag.

2.4.3 Progesteron-Nuklear-Rezeptor

Zur Progesteron-Nuklear-Rezeptorbestimmung wurde das synthetische Gestagen R 5020 (17,21-Dimethyl-19-Nor-4,9-Pregnan-3,20-dion) verwandt. Der Aufbau des Progesteron-Nuklear-Rezeptor Assay entsprach dem des Östradiols. Es wurden im Doppelansatz 100 ul Nuklearsuspension mit 10 nMol (3H)-Progesteron R 5020 und einem 1000-fachen Überschuß nicht markierten Progesterons zur Ermittlung der unspezifischen Bindung oder mit 100 ul Puffer C ohne Zusatz von nicht-markierten Progesteron zur Ermittlung der totalen Bindung inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug 24 Stunden bei einer Temperatur von 4 C, wobei

für eine ständige Durchmischung des Reaktionsansatzes gesorgt war. Der Reaktionsstop erfolgte durch Hinzugabe von 1,5 ml Puffer D, worauf die 15 min Zentrifugation bei 850 x g in einer Kühlzentrifuge erfolgte, anschließend zweimaliges Waschen des Sediments mit 1,5 ml Puffer D und Hinzugabe von 0,2 ml Soluen zum letzten Rückstand. Nach 24 Stunden wurden 0,4 ml Ethanol hinzugefügt, gemischt, 0,5 ml in ein Packard-Röpfchen abpipettiert, und die resultierende Radioaktivität gemessen.

2.4.4 DNS-Bestimmung

Die DNS-Bestimmung wurde nach einem photometrischen Verfahren nach Ceriotti durchgeführt (17). Indol ergibt mit der DNS eine gelbe Farbreaktion, deren Stärke im Bereich von 2,5-15 mg DNS/l direkt proportional zum DNS-Gehalt ist. Indol reagiert ebenso mit verschiedenen Zuckern und aliphatischen Aldehyden, wobei sich die dabei entstehenden Farbkomplexe mit Chloroform extrahieren lassen. Der Indol-DNS-Farbkomplex ist praktisch nur in der wäßrigen Phase löslich und bleibt daher erhalten. Er wird photometrisch anhand einer Standardkurve bestimmt, und der DNS-Gehalt errechnet.

2.4.4.1 Material

0,04% Indol-Lösung (Merck), konz.HCl (Merck), Chloroform reinst (Merck), Human-DNS (Perak, Berlin).

2.4.4.2 Methode

Es wurde eine Standard-DNS-Lösung in den Konzentrationen von 2,5-15 mg DNS/l hergestellt. 1 ml Testsuspension (Nukleärsuspension in einer Verdünnung 1:600) bzw. 1 ml DNS-Standardlösung oder 1 ml HCl für die Wasserprobe werden mit jeweils 1 ml 0,04% Indol-Lösung versetzt, 1 ml konz. HCl hinzugefügt, der Inhalt durchmischt, verschlossen und dann 10 min bei 100 C im Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen werden 5 ml Chloroform zugegeben, und die beiden Phasen mit einem Whirler vermischt. Anschließend werden die Phasen in einer Tischzentrifuge (HN-S II Centrifuge, Damon) getrennt, und die Chloroformphase abgesaugt. Dieser Vorgang wird dreimal wiederholt. Aus der gereinigten wäßrigen Phase, die den DNS-Indol-Farbkomplex enthält, wird eine Probe entnommen, und in einem Eppendorffphotometer (Methelers & Rinz, Hamburg) bei 492 nm die Extinktion der Probe gemessen. Anhand der Standardkurve wird die in der Testsuspension enthaltene DNS bestimmt.

2.4.5 Berechnung des Rezeptorgehalts

Die Berechnung des Östradiol-Nuklear-Rezeptors bzw. des Progesteron-Nuklear-Rezeptors wurde nach der folgenden Formel berechnet, und die Konzentration in fMol/mg DNS angegeben:

$$R_n = (B_t - B_v) \times 10 / SA \times D_n \text{ [fMol/mg DNS]}$$

R_n ist dabei der Nuklear-Rezeptor in fMol/mg DNS, B_t ist die Rate des Zerfalls des mit Tritium markierten Hormons, das an den Kern gebunden war, in Abwesenheit von nicht markierten Hormon, angegeben in cpm. B_v ist die Rate des Zerfalls von markiertem, an den Kern gebundenen Hormon in Anwesenheit eines 1000-fachen Überschusses von nicht markiertem Steroidhormon. Die an den Nuklear-Rezeptor gebundene Menge markierten Hormons wird aus der Differenz ($B_t - B_v$) errechnet. SA ist die spezifische Aktivität des markierten Hormons, korrigiert auf die gezählte Zerfallsrate in cpm pro fMol. D_n der DNS-Gehalt der Nuklearsuspension in mg pro ml Nuklearsuspension. Der Faktor 10 dient der Umrechnung der verwendeten Menge Nuklearsuspension von 100 µl auf 1 ml. Die Konzentration der Rezeptoren im Kern läßt sich auch je Zelle angeben in Bindungsstellen/Zelle, wobei 7 pg DNS/diploiden Chromosomensatz und eine gleichmäßige Verteilung der Rezeptoren und der DNS unter den Zellen angenommen wurde.

3. ERGEBNISSE

3.1 ERGEBNISSE DER VORSTUDIEN

Zunächst wurden Vorstudien durchgeführt, um zu untersuchen, wie die Bindung des Hormons an den Rezeptor beeinflusst werden kann.

Es war die Frage zu klären, welchen Einfluß die Temperatur, die Inkubationszeit und die Konzentration des tritierten Steroidhormons auf die spezifische Bindung an den Nuklear-Rezeptor hat, und inwieweit der Hormon-Rezeptor-Komplex stabil ist.

Die folgenden theoretischen Studien wurden mit einer Nuklearsuspension durchgeführt, die von mehreren Endometrien gewonnen wurde, da vielfach die von einem Endometrium zur Verfügung stehende Menge zu gering war, um eine mehrfache Bestimmung durchzuführen.

3.1.1 Östradiol-Nuklear-Rezeptor

3.1.1.1 Steigende Menge Nuklearsuspension

Die bei 4 C und 24 h Inkubationszeit besetzten Nuklear-Rezeptoren sind der eingesetzten Menge Nuklear-Suspension proportional, wie die Abbildung 2 zeigt.

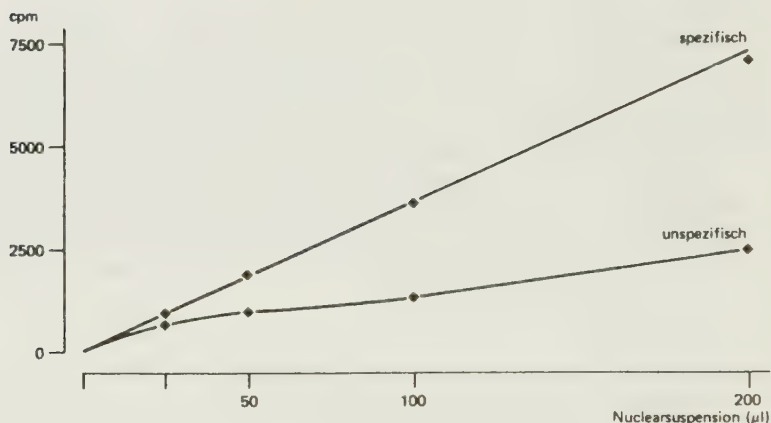


Abb. 2: Steigende Menge Nuklearsuspension

Die unspezifische Bindung nimmt relativ zur totalen Bindung mit steigender Menge Nuklearsuspension ab. Bei 100 µl Nuklearsuspension betrug die unspezifische Bindung ca. 30%, d. h. von dem (3H)-Östradiol, das nach der Trennung von freiem und gebundenem (3H)-Östradiol (siehe unter Methode) nachweisbar war, wurden 70% an spezifischen Rezeptoren für Östradiol gebunden.

Einer Verdoppelung der eingesetzten Menge Nuklearsuspension folgt eine Verdoppelung der spezifischen Bindung. Eine größere Menge als 100 µl Nuklearsuspension konnte aufgrund der geringen Endometriummengen im Orginalassay nicht eingesetzt werden.

3.1.1.2 Steigende Konzentrationen von (3H)-Östradiol

Eine Veränderung der (3H)-Östradiol Konzentration, wie sie Abbildung 3 zeigt, führt zu einem Anstieg der nachweisbaren Rezeptoren.

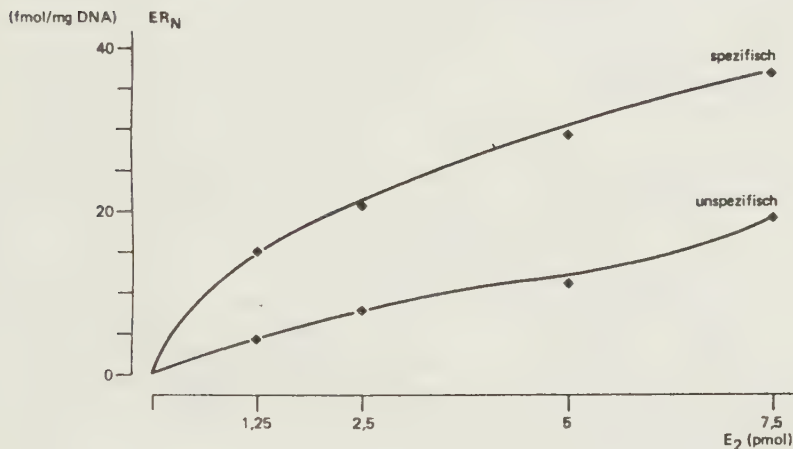


Abb. 3: Steigende Konzentration (3H)-Östradiol

Dieser Anstieg ist linear im untersuchten Bereich, der einer Konzentration von 5 nMol bis 30 nMol entspricht, aus einer Verdoppelung der Konzentration von (3H)-Östradiol resultiert jedoch keine Verdoppelung der erfaßten Nuklear-Rezeptor-Konzentration. Bei 10 nMol (3H)-Östradiol werden nicht alle Rezeptoren, die vorhanden sind, besetzt.

Eine Konzentrationserhöhung führte jedoch zu einer Verschlechterung des Verhältnisses von spezifischer zu totaler Bindung. Der Anteil des spezifisch an Rezeptoren gebundenen Östradiols betrug bei einer Konzentration von 10 nMol (3H)-Östradiol stets mehr als 40%, wohingegen bei höheren Konzentrationen zum Teil spezifische Bindungen unter 10 % bezogen auf die totale Bindung festgestellt wurden.

Eine spezifische Bindung von unter 10% läßt jedoch keine Auswertung mehr zu, da in diesem Bereich die Schwankungen der Einzelbestimmungen lagen.

3.1.1.3 Zeitstudie

Abbildung 4 zeigt das Ergebnis einer Studie, bei der außer der Zeit alle anderen Variablen konstant gehalten wurden.

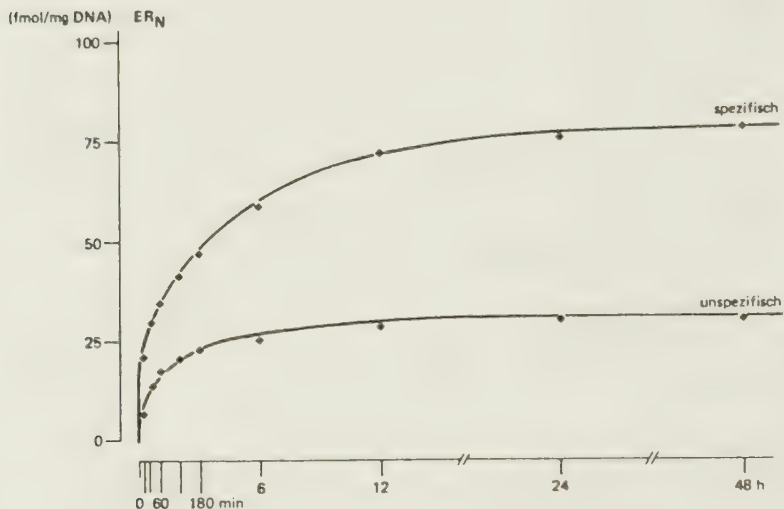


Abb. 4: Zeitstudie Östradiol

Es zeigt sich, daß der Nuklear-Rezeptor langsam von markiertem Östradiol besetzt wird und nach 24 Stunden keine weitere Bindung von Östradiol an den Rezeptor stattfindet. Der Nuklear-Rezeptor ist unter diesen Bedingungen für mindestens weitere 24 Stunden stabil. Bei kürzeren Inkubationszeiten als 24 Stunden sind die Nuklear-Rezeptoren erst zum Teil mit markiertem Östradiol besetzt (nach 3 Stunden ca. 50%). Die unspezifische Bindung steigt schneller

an, bleibt dann auf einem konstanten Niveau. Sie beträgt ca. 30% der spezifischen Bindung.

3.1.1.4 Kombinierte Zeit- und Temperaturstudie

Abbildung 5 zeigt das Ergebnis dieser kombinierten Zeit- und Temperaturstudie. Die Angabe der Rezeptoren erfolgte in fmol/mg DNS.

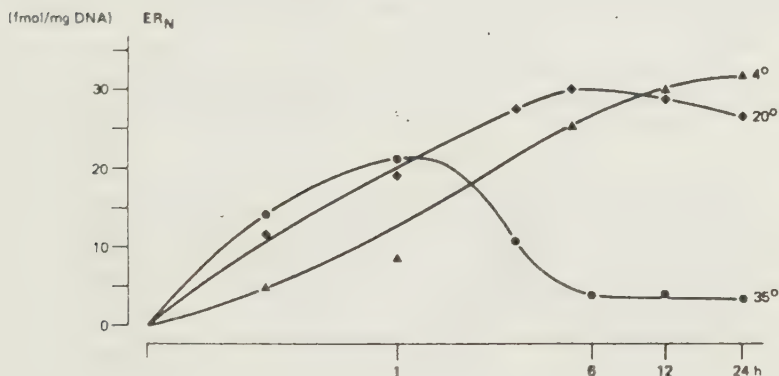


Abb. 5: Kombinierte Zeit- und Temperaturstudie

Bei 4°C Inkubationstemperatur steigt die spezifische Bindung langsam an und erreicht nach 24 Stunden ihren höchsten Wert. Bei 20°C Inkubationstemperatur erfolgt eine schnellere Bindung des Östradiols an den Rezeptor als bei 4°C. Nach 6 Stunden sinkt der Nuklear-Rezeptorgehalt leicht ab. Nach 24 Stunden Inkubationsdauer liegt der Nuklear-Rezeptorgehalt geringfügig unter dem bei 4°C und 24 Stunden Inkubationsdauer ermittelten Nuklear-Rezeptorgehalt. Bei einer Erhöhung der Temperatur auf 35°C ergibt sich dagegen bereits ein Abfall der Bindung nach etwa 2 Stunden,

und nach 24 Stunden ist die Bindung auf etwa 5% bezogen auf die 4°C Bindung abgesunken. Im frühen Inkubationsbereich läßt sich erkennen, daß eine Temperaturerhöhung zu einer beschleunigten Bindung des Östradiols an den Rezeptor führt. Aus einer Verkürzung der Inkubationsdauer resultiert eine Vergrößerung der Streuung zwischen den Doppelbestimmungen.

3.1.1.5 Austauschstudie

Inwieweit sich das an den Nuklear-Rezeptor gebundene markierte Östradiol wieder durch die Zugabe eines 1000-fachen Überschusses von nicht markiertem Östradiol verdrängen ließ, zeigt die Abbildung 6.

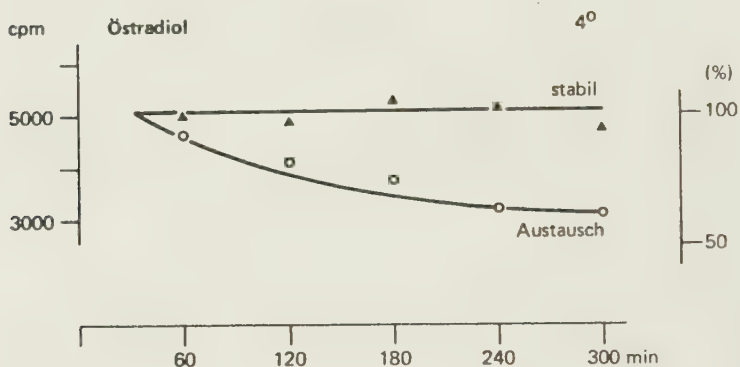


Abb. 6: Austauschstudie

Der Östradiol-Nuklear-Rezeptorkomplex ist während der untersuchten Zeit stabil. Der Austausch des an den Rezeptor gebundenen markierten Hormons durch den 1000-fachen

Überschuß nicht markierten Östradiols vollzieht sich innerhalb von 3 Stunden. Danach läßt sich der Austausch nicht mehr steigern. Es werden in diesem Versuch ca. 40% spezifisch an den Rezeptor gebundenes markiertes Östradiol durch das nicht markierte Hormon verdrängt.

3.1.1.6 Austauschstudie mit Vorabsättigung

Die Nuklear-Rezeptoren entstammen der Translokation von Hormon-Rezeptorkomplexen aus dem Cytosol in den Kern. Es fanden sich im Nukleus zusätzlich zu den Nuklear-Hormon-Rezeptorkomplexen auch nicht mit endogenem Hormon besetzte Akzeptorstellen sogenannte 'freie' Rezeptoren.

Es war daher die Frage zu klären, ob mit dieser Methode sowohl die Nuklear-Hormon-Rezeptorkomplexe als auch 'freien' Nuklear-Rezeptoren erfaßt werden und eine Verdrängung von an Nuklear-Rezeptoren gebundenem Hormon durch markiertes Hormon stattfindet.

Bei 4 °C Inkubationstemperatur ergibt sich ein ähnliches Bild, wie es die Abbildung 4 schon zeigte. Die Abbildung 7 zeigt, daß der Austausch bei 4 °C Inkubationstemperatur langsam verläuft. Nach 2 Stunden sind erst ca. 25% der nach 24 h ausgetauschten Rezeptoren von markierten Östradiol besetzt. Bei 20 °C Inkubationstemperatur vollzieht sich dieser Austausch schneller. Hier wurden nach 2 Stunden so viele Rezeptoren ausgetauscht wie bei 4 °C innerhalb von 24 Stunden. Bei kürzeren Inkubationszeiten tritt eine größere Streuung zwischen den Doppelbestimmungen auf. Bei einer Temperaturerhöhung auf 30 °C verläuft dieser Austausch noch schneller.

Der Östradiol-Nuklear-Rezeptorkomplex ist unter diesen Bedingungen nicht stabil. Nach 24 Stunden Inkubationszeit bei 30 °C lassen sich kaum noch Rezeptoren nachweisen.

Die Austauschrate läßt sich sowohl durch eine Erhöhung der Temperatur als auch durch eine Verlängerung der Inkubationsdauer steigern, wobei oberhalb von 30 °C bei längerer Inkubationszeit der Nuklear-Rezeptor instabil wird. Eine kurze Inkubationszeit führt zu einer größeren Streuung zwischen den Doppelbestimmungen, weshalb auf eine Inkubationstemperatur von 20 °C verzichtet wurde.

Ein Vergleich mit den vor der 'Vorabsättigung' bestimmten Rezeptoren ergibt, daß bei 20 °C ca. 80% des an den Rezeptor gebundenen Östradiols von nicht markierten Östradiol verdrängt wird, bei 4 °C betrug die Austauschrate etwa 50%, bei einer größeren Übereinstimmung der Doppelbestimmungen. Es lassen sich mit dieser Methode 'freie' und weitgehend die mit endogenem Östradiol besetzten Rezeptoren nachweisen.

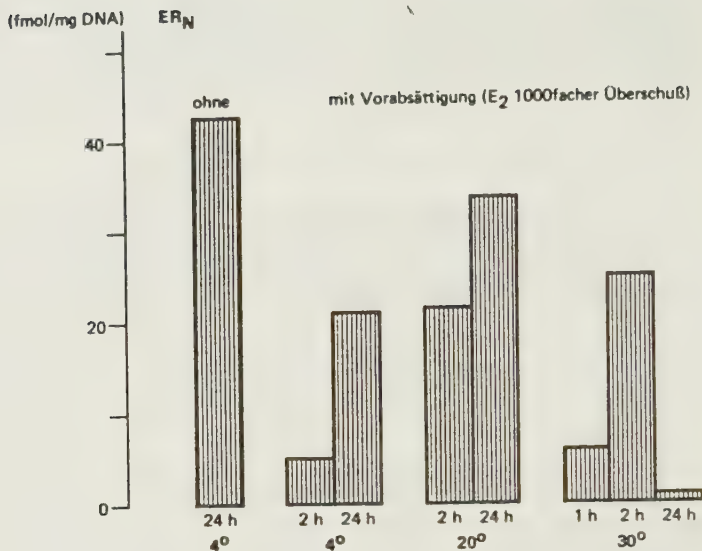


Abb. 7: Austauschstudie mit Vorabsättigung

3.1.1.7 Scatchard-Analyse

Die Dissoziationskonstante (K_d), die grafisch aus der Scatchard-Plott-Analyse ermittelt wurde, liegt für den Östradiol-Rezeptor zwischen 9×10^{-9} und $4,4 \times 10^{-10}$ Mol/l. Die Abbildungen 8, 9 und 10 zeigen beispielhaft einige dieser Analysen.

3.1.2 Progesteron-Nuklear-Rezeptor

Der Progesteron-Nuklear-Rezeptor wurde in gleicher Weise untersucht, wie der Östradiol-Nuklear-Rezeptor.

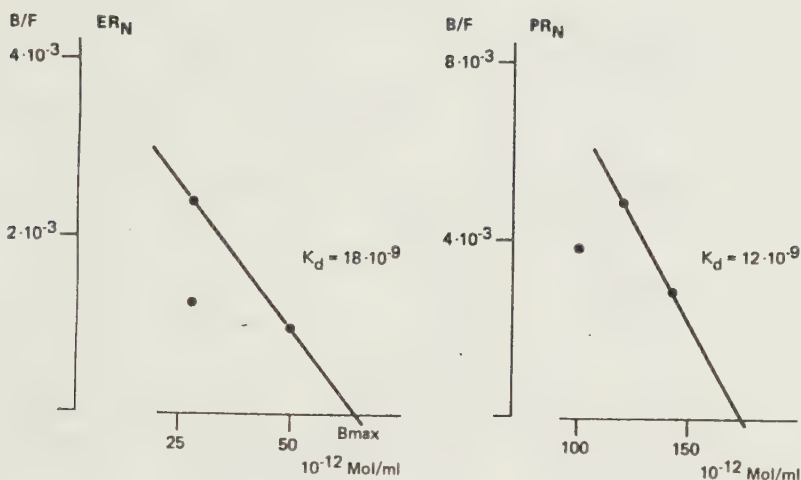


Abb. 8: Scatchard-Plott-Analyse

3.1.2.1 Steigende Menge Nuklearsuspension

Bei einem Einsatz von steigenden Mengen Nuklearsuspension zeigt sich beim Progesteron-Nuklear-Rezeptor, daß mit steigender Menge Nuklearsuspension ebenso die spezifische Bindung an den Rezeptor zunimmt, wie das beim Östradiol-Nuklear-Rezeptor der Fall war. Abb. 2

3.1.2.2 Steigende Menge (3H)-Progesteron

Wurden 100 µl Nuklearsuspension bei 4 °C über 24 Stunden mit einer steigenden Konzentration von (3H)-Progesteron inkubiert, so ergibt sich ein lineares Ansteigen der spezifischen Bindung. Dieser Anstieg ist steiler als beim Östradiol-Nuklear-Rezeptor. Abb. 11

Wie beim Östradiol-Rezeptor ging eine höhere Bindung bei steigender Konzentration mit einem relativ stärkeren Anstieg der unspezifischen Bindung einher. So wurde für die Progesteron-Rezeptor-Bestimmung eine Konzentration von 10

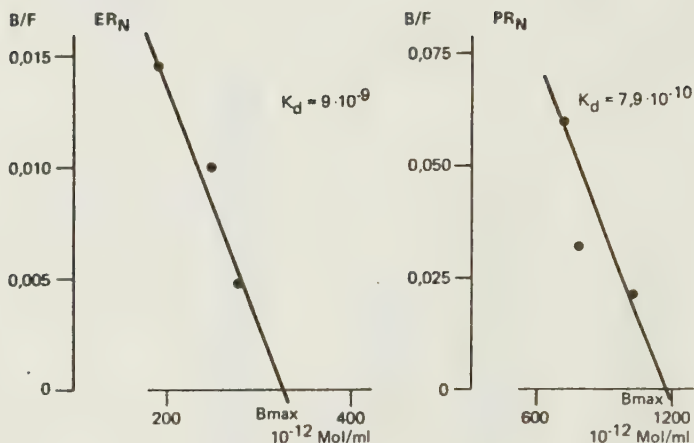


Abb. 9: Scatchard-Plott-Analyse

nMol pro 100 µl Nuklearsuspension verwandt, da sich bei 10 nMol die günstigste Relation zwischen spezifischer zu unspezifischer Bindung ergab. Der Anteil der unspezifischen Bindung an der totalen Bindung betrug je nach der Bestimmung zwischen 20% und 60%.

3.1.2.3 Zeitstudie

Die Abbildung 12 zeigt das Ergebnis der Zeitstudie. Die Bindung des Progesterons an den Rezeptor verläuft wesentlich schneller als beim Östradiol. Dies wird besonders bei kurzen Inkubationszeiten deutlich. Nach 24 Stunden sind alle erreichbaren Rezeptoren besetzt, und der Progesteron-Nuklear-Rezeptorkomplex ist für weitere 24 Stunden stabil.

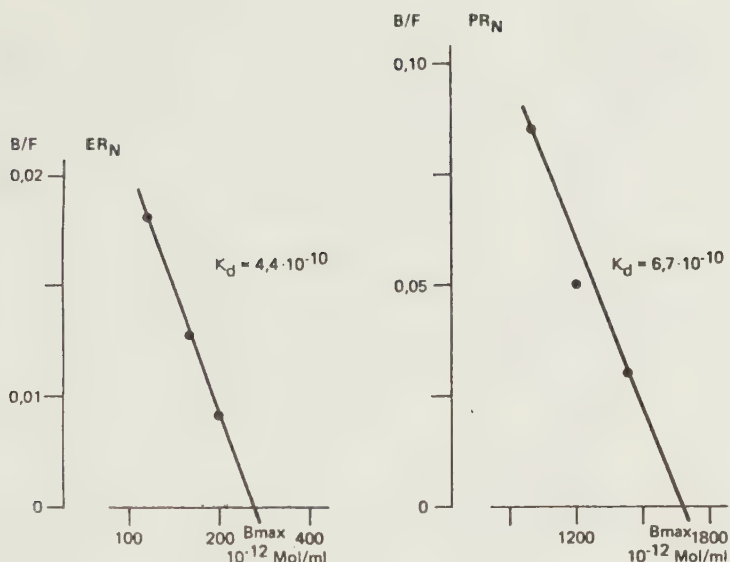


Abb. 10: Scatchard-Plott-Analyse

3.1.2.4 Kombinierte Zeit- und Temperaturstudie

Das Ergebnis der kombinierten Zeit- und Temperaturstudie zeigt Abbildung 13. Die Bindungskurve des Progesterons an den Rezeptor verläuft hier bei den Inkubationstemperaturen 4 °C und 20 °C fast parallel, wohingegen bei einer Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 35 °C eine durchgehende niedrigere Bindung des Progesterons festzustellen ist. Die Absättigung des Progesteron-Rezeptors vollzieht sich in kürzerer Zeit als die Absättigung des Östradiol-Rezeptors. Bei 35 °C Inkubationstemperatur nimmt die Zahl der nachweisbaren Bindungsstellen ab. Im Vergleich zum Östradiol-Rezeptor ist die Abnahme geringer.

3.1.2.5 Austauschstudie

Das Ergebnis der Austauschstudie zeigt Abbildung 14. Die totale Bindung zeigt keine Abnahme. Ca. 40% der totalen Bindung werden bei diesen Konditionen (4 °C und 24 Stunden)

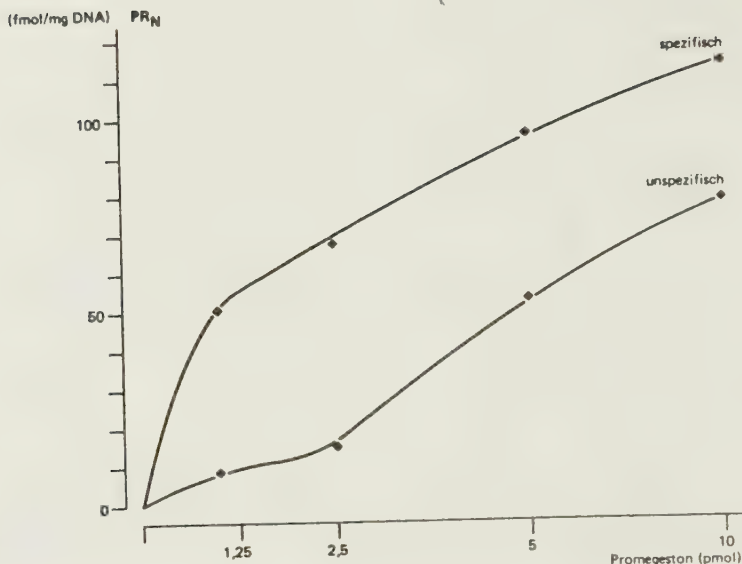


Abb. 11: Steigende Menge (3H)-Promegeston

durch den 1000-fachen Überschuß nicht markierten Progesterons ausgetauscht. Dies geschieht innerhalb von 120 min. Eine Verlängerung der Inkubationszeit darüber hinaus führt zu keiner gesteigerten Austauschrate. Zum Unterschied zum Östradiol-Rezeptor erfolgt die Verdrängung des Progesterons vom Rezeptor in der Hälfte der Zeit.

3.1.2.6 Austausch bei Vorabsättigung

Für den Progesteron-Nuklear-Rezeptor war ebenso zu klären, inwieweit unter den verwendeten Konditionen die bestimmten Nuklear-Rezeptoren 'freien' also nicht von endogenem Progesteron besetzten Rezeptoren entsprachen, oder ob das endogene Progesteron, das an die Rezeptoren gebunden ist, durch das markierte Promegeston verdrängt wird, diese Rezeptoren also ebenfalls erfaßt werden. Es wurden analoge Versuchsbedingungen zum Östradiol-Rezeptor gewählt. Das zugesetzte markierte Promegeston bindet schnell an die mit nicht markierten Progesteron besetzten Rezeptoren. Nach

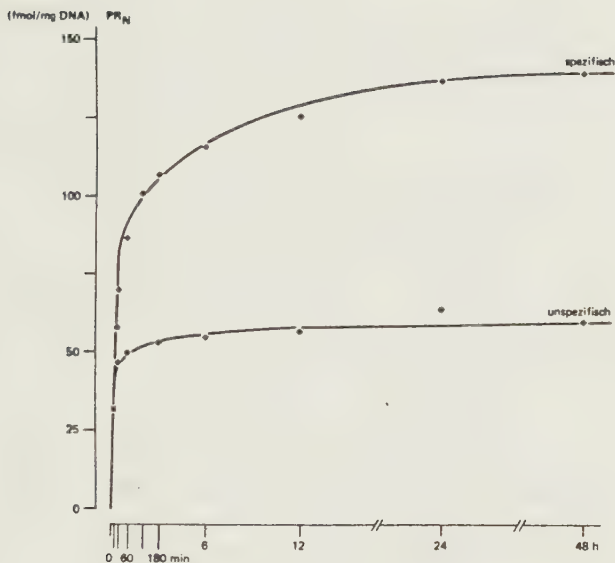


Abb. 12: Zeitstudie

6 Stunden ist dieser Austausch abgeschlossen, und es läßt sich bei einer Verlängerung der Inkubationsdauer keine höhere Bindung erzielen. Der Progesteron-Nuklear-Rezeptorkomplex ist stabil. Bei 30 °C ergibt sich ein höherer Austausch nach 1 Stunde, nach 24 Stunden ist jedoch die Rezeptorkonzentration abgesunken, was ein Vergleich mit den nach 24 Stunden und 4 °C bestimmten Rezeptoren zeigt. Im Vergleich mit den vor Inkubation mit 10 pMol Progesteron erreichbaren Bindungsstellen, die sich aus den 'freien' und den mit endogenem Hormon besetzten Rezeptoren zusammensetzen, welche ausgetauscht wurden, zeigt sich folgendes:

Bei 4 °C Inkubationstemperatur und einer Inkubationsdauer von 24 Stunden werden ca. 75% der mit Progesteron besetzten Bindungsstellen durch markiertes Progesteron ausgetauscht. Die Austauschrate läßt sich durch eine Erhöhung der Inkubationstemperatur beschleunigen, wobei bei längeren Inkubationszeiten eine Instabilität des Progesteron-Nuklear-Rezeptorkomplexes auftritt.

Ein Vergleich mit dem Östradiol-Rezeptor zeigt, daß der Austausch schneller verläuft, was insbesondere bei niedrigeren Temperaturen deutlich wird. Abb. 7

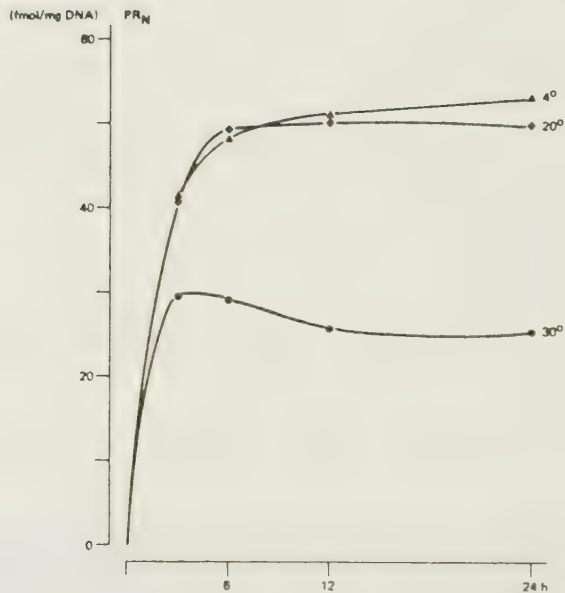


Abb. 13: Kombinierte Zeit- und Temperaturstudie

3.1.2.7 Scatchard-Analyse

Ebenso wie für den Östradiol-Rezeptor wurden für den Progesteron-Rezeptor eine Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_d) mit Hilfe der grafischen Scatchard-Analyse durchgeführt. Dabei ergaben sich K_d von $7,9 \times 10^{-10} \text{ Mol/l}$

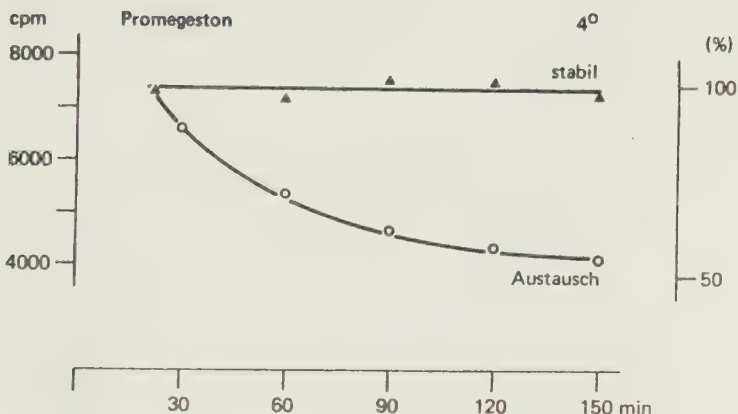


Abb. 14: Austauschstudie

bzw. $6,7 \times 10^{-10}$ bzw. $1,8 \times 10^{-8}$ Mol/l. (Abb. 8, 9 und 10).

3.2 ZUSAMMENFASSUNG DER METHODISCHEN ERGEBNISSE

Aufgrund dieser Ergebnisse aus den Voruntersuchungen wurden die Konditionen für den Nachweis östrogen und Progesteron bindender Rezeptoren gewählt.

Eine Inkubationstemperatur von 4°C gewährleistet eine hohe Stabilität des Hormon-Rezeptorkomplexes. Die Bindung des Hormons an den Rezeptor verläuft langsam, insbesondere beim Östradiol, es kann jedoch durch eine Verlängerung der Inkubationsdauer eine ebenso hohe Bindung wie bei höheren Temperaturen erreicht werden, ohne daß es dabei zu einer Instabilität des Rezeptors kommt. Bei der verwendeten Konzentration von markiertem Hormon, jeweils 10 nMol, ergab sich das beste Verhältnis zwischen unspezifischer zu spezifischer Bindung.

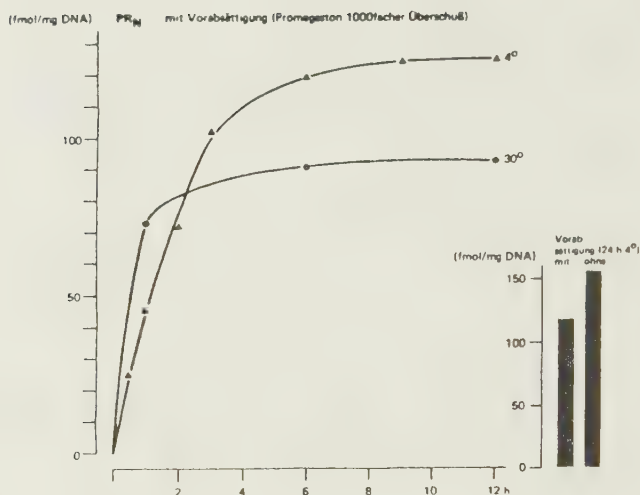


Abb. 15: Austauschstudie mit Vorabsättigung

Bei dieser Methode werden nicht sämtliche Rezeptoren erfaßt, was für eine Aussage über die Schwankungen im Zyklus von untergeordneter Bedeutung ist. Die absolute Zahl der vorhandenen Bindungsstellen ließe sich nur aus Scatchard-Analysen berechnen, wozu die Endometriummengen im allgemeinen nicht ausreichte, sodaß hier auf Einpunktbestimmungen zurückgegriffen werden mußte. Die Abbildungen 8, 9 und 10 zeigen beispielhaft an einigen Endometrien solche Scatchard-Analysen.

3.3 ÖSTRADIOL- UND PROGESTERON-NUCLEAR-REZEPTOREN WÄHREND DES MENSTRUALEN ZYKLUS

Die Bestimmung der Nuclear-Rezeptoren für Östradiol und Progesteron wurde nach dem in der Methode beschriebenen Verfahren durchgeführt. Der Zyklus wurde in vier Phasen eingeteilt, die sich auf den Zeitpunkt der Ovulation ausehend auf einem 28-tägigen Zyklus beziehen. In der nachfolgenden Tabelle ist der Nuclear-Rezeptor-Gehalt

angegeben in fMol/mq DNS. Die statistische Auswertung wurde mit dem Zwei-Stichproben-Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben vorgenommen, wobei als Vertrauensgrenzen für die Rangsumme $2a = 0,05$ angenommen wurde (26).

Tab. 3.

Nuklearezeptor-Konzentration

Zyklusphase	Östradiol-N.R. fMol/mq DNA	Progesteron-N.R. fMol/mq DNA
Frühe proli- ferative Phase (n=8)	121,6±96	277,3±157
Späte proli- ferative Phase (n=9)	150,7±98,4	551,2±270
Frühe sekre- torische Phase (n=5)	110,5±62	243,6±145
Späte sekre- torische Phase (n=6)	61,8±44	157,0± 60

Die Abbildungen 16 und 17 zeigen die grafische Darstellung der Ergebnisse für den Östradiol- bzw. den Progesteron-Nuklear-Rezeptor. Die statistische Betrachtung dieser Ergebnisse ergibt eine relativ große Streuung des Nuklear-Rezeptorgehalts des Endometriums um die Mittelwerte der einzelnen Perioden.

3.3.1. Östradiol-Nuklear-Rezeptor

Beim Östradiol-Nuklear-Rezeptor sind die Veränderungen im Rezeptorgehalt des Gewebes geringer ausgeprägt als beim Progesteron-Nuklear-Rezeptor. Während der frühen proliferativen Phase beträgt der Östradiol-Nuklear-Rezeptor Gehalt des Endometriums $121,6 \pm 96$ fMol/ mq DNS mit einer Tendenz Anzusteigen. In der späten Proliferationsphase beträgt der Mittelwert $150,7 \pm 98,4$ fMol/ mq DNS. Während der frühen sekretorischen Phase sinken die

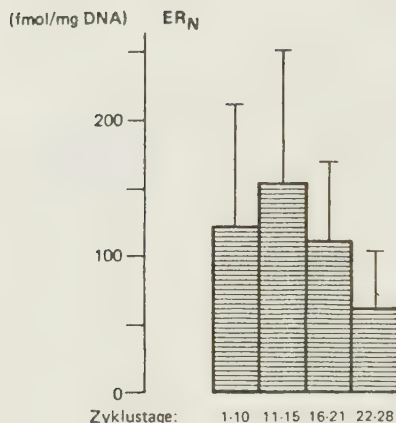


Abb. 16: Östradiol-Nuklear-Rezeptor
Schwankungen im Östradiol-Nuklear-Rezeptorgehalt
während des menstrualen Zyklus

Nuklear-Rezeptorkonzentrationen für Östradiol gering auf $110,5 \pm 62$ fmol/mg DNS ab, um dann in der späten Sekretionsphase auf die niedrigsten Werte im gesamten Zyklusverlauf abzusinken. Hier ergaben sich Rezeptorkonzentrationen von $61,8 \pm 44$ fmol/mg DNS. Die höchsten Konzentrationen von Östradiol-Nuklear-Rezeptoren findet man in der späten proliferativen Phase, wohingegen die niedrigsten Spiegel in der späten sekretorischen Phase vorliegen. Der Unterschied zwischen der späten Proliferationsphase und der späten Sekretionsphase ist signifikant. Die Veränderungen zwischen den anderen Phasen dagegen nicht. Die höchsten Nuklear-Rezeptorkonzentrationen fanden sich mitzyklisch, die Signifikanz ließe sich jedoch nur bei einer größeren Menge sichern.

3.3.2 Progesteron-Nuklear-Rezeptor

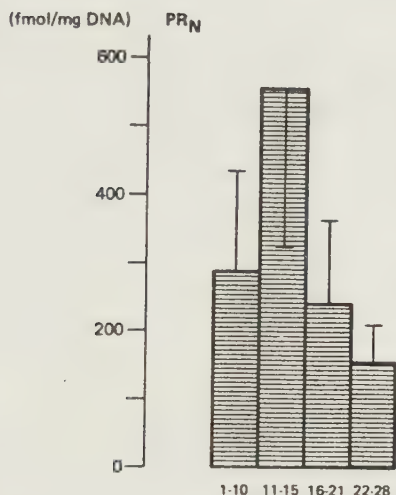


Abb. 17: Progesteron-Nuklear-Rezeptor
Schwankungen des Progesteron-Nuklear-Rezeptors
während des menstrualen Zyklus

Die Varianz des Progesteron-Nuklear-Rezeptor liegt über der des Östradiol-Nuklear-Rezeptor, und es wurde insgesamt eine höhere Rezeptorkonzentration für den Progesteron-Nuklear-Rezeptor festgestellt. In der frühen Proliferationsphase werden schon relativ hohe Nuklear-Rezeptorkonzentrationen erreicht. ($277,6 \pm 157$ fMol/mg DNS). Zur späten Proliferationsphase steigt der Nuklear-Rezeptorgehalt auf $551,2 \pm 270$ fMol/mg DNS an. Der Anstieg ist bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 10% gesichert, jedoch nicht signifikant bei 0,05. Anschließend sinken die Rezeptoren ab. In der frühen sekretorischen Phase ergab sich ein Gehalt von $243,6 \pm 145$ fMol/mg DNS, wohingegen in der späten sekretorischen Phase der Progesteron-Nuklear-Rezeptor Gehalt auf $157,0 \pm 60$ fMol/mg DNS abfällt. Der Unterschied zwischen der II.Phase und der IV.Phase ist signifikant.

Die höchsten Nuklear-Rezeptorspiegel wurden zwischen dem 10. Tag und dem 18. Tag des Zyklus erreicht. Dieser Unterschied gegenüber den anderen Zyklusabschnitten war signifikant.

Für den Östradiol-Nuklear-Rezeptor sowie für den Progesteron-Nuklear-Rezeptor gilt, daß schon in der ersten Zyklusphase hohe Nuklear-Rezeptorspiegel im Endometrium vorliegen, wohingegen in der letzten Zyklusphase die geringsten Nuklear-Rezeptorkonzentrationen festzustellen sind. Die höchsten Rezeptorspiegel finden sich in der späten proliferativen Phase. Der Abfall von der II. Phase zur IV. Phase ist für den Östradiol-Rezeptor wie für den Progesteron-Rezeptor signifikant.

4. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, die Veränderungen im Nuklear-Rezeptorgehalt des Human-Endometrium zu untersuchen. Methodisch wurde der erstmals von Anderson et al. für den Östradiol-Nuklear-Rezeptor des Rattenuterus beschriebene Nuklear-Rezeptorassay benutzt (2). Nach entsprechenden Voruntersuchungen wurde der Assay geringfügig modifiziert, um für die Bestimmung der nuklearen Rezeptorstellen für Östradiol und Progesteron im Human-Endometrium optimale Bedingungen zu erhalten. Durch das zur Gewebeaufbereitung verwendete Verfahren der schnellen Druckdekompensation ließ sich eine Suspension von Zellkernen herstellen, die weitgehend von cytoplasmatischen Bestandteilen und noch intakten Zellen befreit war, was mikroskopische Untersuchungen bestätigten. Damit war gewährleistet, daß in den Untersuchungen über den Nuklear-Rezeptor nur die im Zellkern vorhandenen Akzeptorstellen erfaßt wurden.

4.1 THEORETISCHE VORSTUDIEN ÖSTRADIOL-NUKLEAR-REZEPTOR

Die dazu vorgenommenen theoretischen Untersuchungen für das Verhalten des Östradiol- und Progesteron-Nuklear-Rezeptors zeigen eine unterschiedliche Kinetik der Bindung des Östradiols und Progesterons an den Rezeptor. Im Vergleich zum Progesteron verläuft die Bindung des Östradiols an den Nuklear-Rezeptor langsamer. (Abb. 4) Unter den verwandten Konditionen (4 C) ließ sich eine maximale Bindung des Östradiols an den Rezeptor nach 24 Stunden

feststellen. Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur führt zu einer Beschleunigung der Bindung, andererseits führt dies zu einer größeren Instabilität des Nuklear-Rezeptors (Abb. 5). Diese Instabilität des Rezeptors bei höheren Temperaturen wurde von Sutherland et al. (121) auf eine proteolytische Aktivität zurückgeführt, die besonders in der Cyto-solfraktion beobachtet wurde.

Zusätzlich wurden bei höheren Inkubationstemperaturen, insbesondere bei kurzen Inkubationszeiten, größere Streuungen zwischen den Doppelbestimmungen beobachtet. Aus diesen Gründen wurde die niedrige Inkubationstemperatur gewählt.

Entgegen den Mitteilungen von Sanborn et al. (103) konnte bei 4 C ein Austausch von an den Rezeptor gebundenen nicht markierten Östradiol durch markiertes Östradiol nach 24 Stunden Inkubationsdauer beobachtet werden. (Abb. 7) Der Austausch ließ sich durch eine Temperaturerhöhung beschleunigen, wobei die oben beschriebenen Probleme auftraten, war jedoch der Austauschrate, die bei 4 C und 24 Stunden erreicht wurde, vergleichbar.

4.2 THEORETISCHE VORSTUDIEN PROGESTERON-NUKLEAR-REZEPTOR

Zur Bestimmung der Progesteron-Nuklear-Rezeptoren wurde das synthetische Gestagen R 5020 verwandt. Es ist dem natürlichen Progesteron bei der Bestimmung der vorhandenen Bindungsstellen vorzuziehen, da es mit geringerer Affinität an das in der Nukleärsuspension noch vorhandene SHBG (Sexualsteroidbindendes -Globulin des Serums) bindet. Die Dissoziationsrate des R 5020-Rezeptorkomplexes ist um den Faktor 6-8 geringer als der des natürlichen Progesteron-Rezeptorkomplexes (74, 89).

Die Bindung des Progesterons an den Rezeptor, sowie die Verdrängung des markierten Progesterons durch nicht-markiertes Progesteron verläuft schneller als beim Östradiol (Abb. 12 und Abb. 14). Der Austausch von mit endogenem Hormon besetzten Rezeptoren durch markiertes Progesteron vollzieht sich ebenfalls in kürzerer Zeit (Abb. 15).

Die Beeinflussbarkeit dieser Bindung durch eine Temperaturerhöhung ist geringer als beim Östradiol-Nuklear-Rezeptor, sodaß eine Inkubationstemperatur von 4 C und 24 Stunden Dauer ausreicht, um die 'freien' als auch die mit endogenem Hormon besetzten Rezeptoren zu erfassen. Die höhere Dissoziationsrate des Progesteron-Nuklear-Rezeptorkomplexes führt zu diesem schnelleren Austausch (55, 56). Insofern lassen sich die Unterschiede zwischen dem Östradiol- und Progesteron-Nuklear-Rezeptor in bezug auf die Bindung des Hormons sowie der unterschiedlichen Austauschbarkeit von mit endogenem Hormon besetzten Rezeptoren aus den Dissoziationsraten der Hormon-Rezeptorkomplex ableiten. Diese Unterschiede wurden auch von anderen Untersuchern mitgeteilt (6, 9, 103, 121).

4.3 METHODISCHE SCHWIERIGKEITEN

Die Bestimmung der spezifischen Bindungsstellen für Östradiol und Progesteron ist bisher nur indirekt, über die Bindung radioaktiv markierter Steroidhormone möglich. Eine Beindarstellung der Rezeptorproteine gelang bisher erst partiell (109, 115, 116, 117), sodaß noch keine radioimmunologischen Methoden zum direkten Nachweis der Rezeptormoleküle aufgebaut werden konnten.

Für den Nachweis zyklischer Veränderungen des Nuklear-Rezeptorgehalt des Endometriums ist es wichtig, sowohl die 'freien' als auch die mit endogenem Hormon besetzten Rezeptoren (Hormon-Rezeptorkomplexe) zu erfassen (132). Diese Nuklear-Hormon-Rezeptorkomplexe stellen die nach der Bindung mit Östradiol bzw. Progesteron in den Kern translozierten cytoplasmatischen Rezeptoren dar. Neben diesen Nuklear-Hormon-Rezeptorkomplexen kommen im Kern noch 'freie', also nicht mit endogenem Hormon besetzte Rezeptoren vor, deren Rolle bisher nicht eindeutig geklärt ist (39). Diese 'freien' Rezeptoren wurden zuerst in einigen Mammatumorzellkulturen festgestellt, jedoch wurden auch im Human-Endometrium und Myometrium 'freie' Rezeptoren für Östradiol und Progesteron nachgewiesen (36, 50). In Studien mit der Mammatumorzellkultur MCP-7 wurde festgestellt, daß der Progesteron-Rezeptoranstieg in diesen Zellen mit der Bindung von Östradiol an cytoplasmatische Rezeptoren und der Translokation in den Kern, sowie die Bindung von Östrogen an 'freie' Rezeptoren im Kern parallel verläuft. Weiter konnte gezeigt werden, daß diese 'freien' Rezeptoren in den Rezeptorverlust (Processing) einbezogen sind, der kurz nach der einer Östrogenbehandlung dieser Zellen beobachtet wird. Bei einer Unterbrechung der Östrogenzufuhr nimmt der Gehalt von 'freien' Nuklear-Rezeptoren wieder zu (50). Trotzdem bleibt bisher unklar, welche Rolle 'freie' Rezeptoren in der Östrogenwirkung in normalen Geweben haben.

Es ist daher notwendig das an die nuklearen Rezeptoren gebundene endogene Hormon durch markiertes zu verdrängen (73, 137), was mit der Austauschstudie gezeigt werden konnte.

Gegenüber dem Nachweis von Rezeptoren im Cytosol stößt der Nachweis der Rezeptoren im Kern auf größere Schwierigkeiten. Die Trennung von an den Rezeptor gebundenem markiertem Hormon von nicht gebundenem Hormon, etwa durch die Aktivkohle-Dextran-Adsorptionstechnik, scheitert an dem unterschiedlichen Sedimentationsverhalten der Nuklear- und Cytosol-Rezeptoren.

Auf die geringere Zuverlässigkeit dieser Methode wird auch anderenorts hingewiesen (7). Die überhaupt zur Verfügung stehende geringe Anzahl der Gewebe und die dadurch nötige Unterteilung des Zyklus in vier Phasen führten zur hohen Varianz der Nuklear-Rezeptorspiegel in den Gruppen.

Die große Streuung der Nuklear-Rezeptoren in den einzelnen Phasen des Zyklus ist jedoch auch durch die im Serum bzw. die im Gewebe vorhandene erhebliche Varianz der Steroidhormone bedingt (107).

Dieses alles ist bei der Betrachtung der Ergebnisse zu berücksichtigen.

4.4 ÖSTRADIOL- UND PROGESTERON-NUKLEAR-REZEPTOREN

Zyklische Schwankungen des Rezeptorgehalts, die aufgrund der zyklusabhängigen Anreicherung von markierten Östradiol (13, 42) in den uterinen Geweben vermutet wurden, konnten bei einer Reihe von Tier species bestätigt werden (34, 38, 41, 51, 53, 72, 75, 81).

Veränderungen im Rezeptorgehalt des Human-Endometriums während des menstrualen Zyklus wurden von einer Reihe von Untersuchern mitgeteilt, wobei sich die meisten Untersuchungen auf die Rezeptoren im Cytosol erstrecken (7, 24, 32, 52, 82, 91, 94, 99, 108, 129,).

Für den cytoplasmatischen Östradiol-Rezeptor wurden die höchsten Konzentrationen in der mittleren proliferativen Phase beschrieben. Vor der Ovulation kommt es zu einem raschen Abfall der Rezeptoren im Cytosol, der sich in der späten sekretorischen Phase weiter fortsetzt. Hier werden die niedrigsten Konzentrationen des gesamten Zyklus erreicht. (7, 8, 57, 91, 134).

Die von uns gefundenen zyklischen Veränderungen der Konzentration von Östradiol-Nuklear-Rezeptoren entspricht derjenigen des cytoplasmatischen Rezeptors mit einer zeitlichen Verzögerung. Der für den cytoplasmatischen Rezeptor beschriebene rasche Konzentrationsabfall nach der Ovulation fand sich bei den nuklearen Rezeptoren nicht. Es ließ sich zwar ein geringer Abfall in der frühen sekretorischen Phase finden, deutlich jedoch erst in der späten sekretorischen Phase.

Der Progesteron-Rezeptor zeigt ähnliche zyklische Veränderungen, wie sie für den Östradiol-Rezeptor beschrieben wurden. Die höchsten Konzentrationen werden sowohl bei den cytoplasmatischen wie den nuklearen Rezeptoren in der späten proliferativen Phase erreicht. Nach der Ovulation fallen die Konzentrationen zur späten sekretorischen Phase hin stark ab. Der periovulatorische Anstieg ist beim Progesteron-Rezeptor deutlicher ausgeprägt, wie überhaupt die zyklischen Veränderungen eine größere Amplitude zeigen (45, 73, 94, 98). Für den Nuklear-Rezeptor konnten diese Veränderungen durch diese Untersuchung bestätigt werden.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse über die zyklischen Veränderungen der Nuklear-Rezeptoren stimmt mit

der Theorie über die Wirkung der Steroide über einen Hormon-Rezeptor-Mechanismus überein.

Östradiol bewirkt eine de novo Synthese von Östradiol- sowie Progesteron-Rezeptoren im Human-Endometrium (28, 55, 56, 61, 76, 121, 126). Unter dem Einfluß von Östradiol kommt es zu einem Anstieg des Rezeptorgehaltes im Cytoplasma in der ersten Zyklushälfte. Nach Bildung eines Hormon-Rezeptor-Komplexes mit dem Östradiol erfolgt die Translokation in den Kern. Diese Translokation zeigt sich in der vermehrten Bindung an nukleare Akzeptorstellen in der späten proliferativen Phase, wohingegen es im Cytoplasma nur zu einer geringen Zunahme der Rezeptoren kommt (98).

Unter dem vermehrten Einfluß des Progesterons kommt es nach der Ovulation zu einem Absinken der Rezeptorkonzentrationen, der sich zuerst bei den cytoplasmatischen Rezeptoren zeigt, gefolgt von einer Abnahme der nuklearen Rezeptoren (67, 80). Es konnte gezeigt werden, daß eine Progesterongabe zu einem Absinken der Östradiol-Cytosol-Rezeptoren führt (28, 57, 93, 126).

Dieser Einfluß des Progesterons wird durch eine Zunahme der 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (17 β -HSD) in der zweiten Zyklushälfte erklärt. Eine Zufuhr von Progesteron führt im Endometrium zu einer Steigerung der 17 β -HSD (127). Die Aktivität dieses Enzyms ist in der proliferativen Phase des Zyklus niedrig, zeigt dann periovulatorisch erheblichen Anstieg und parallel zum Abfall der Östradiol-Rezeptoren in der zweiten Zyklushälfte hohe Aktivitäten (107).

Diese Aktivitätszunahme der 17 β -HSD geht mit der Zunahme der Progesteron-Gewebekonzentrationen und des Progesteron-Rezeptors einher und fällt parallel zu diesem in der sekretorischen Phase ab. Es ist zu vermuten, daß der mittzyklische Anstieg des Progesterons über den Progesteron-Rezeptor zu einer Induktion der 17 β -HSD führt.

Unter dem Einfluß dieses Enzyms kommt es zu einer vermehrten Umwandlung von Östradiol zu Östron, da eine erheblich geringere Affinität zum Rezeptor besitzt (64).

Es steht weniger Östradiol zur Bildung von Östradiol-Rezeptorkomplexen im Cytosol zur Verfügung, und damit nimmt die Translokation in den Kern ab. Der verminderte Östradioleinfluß führt gleichzeitig zu einer Abnahme der cytoplasmatischen Rezeptoren für Östradiol und Progesteron.

Die Konzentration von Östradiol-Nuklear-Rezeptoren nimmt daher in der zweiten Zyklushälfte ab.

Die Höhe der nuklearen Rezeptoren ist jedoch nicht nur von der Translokation von Hormon-Rezeptorkomplexen aus dem Cytosol abhängig, sondern auch von dem Processing, dem die Nuklear-Rezeptoren unterliegen.

Processing (Rezeptorverlust bzw. Verbrauch von Rezeptoren) wurde bei Untersuchungen an der Mammatumorzellreihe MCF-7 nach einer Östrogengabe beobachtet. Bei dieser Zelllinie,

die in einem östrogenfreien Nährmedium wächst, führt eine Östrogenzufuhr zur Bindung an freie cytoplasmatische Rezeptoren, der Translokation in den Kern und dem Anstieg nuklearer Hormon-Rezeptorkomplexe. Vorhandene freie Östrogen-Nuklear-Rezeptoren werden ebenfalls mit Östradiol besetzt. Der Gesamt-rezeptorgehalt der Zelle nimmt dabei ab. Die Zahl der Nuklear-Hormon-Rezeptorkomplexe entspricht nur 70% der vor Östrogenzufuhr gemessenen Zahl von freien cytoplasmatischen und nuklearen Rezeptoren. Freie Nuklear-Rezeptoren waren nicht mehr feststellbar.

Bei einem anschließenden Östrogenentzug kam es zu einer langsamen Abnahme der Nuklear-Hormon-Rezeptorkomplexe (über 12 Tage), gleichzeitig nimmt der Gehalt an freien Rezeptoren sowohl im Cytosol als auch im Kern wieder zu. Diese Zunahme ist Ausdruck der de novo Synthese von Rezeptoren. Das Processing von Östrogen-Rezeptoren geht der Induktion von Progesteron-Rezeptoren voraus. Die Synthese von Progesteron-Rezeptoren hält unter Östrogenstimulation an und sinkt nach Östrogenentzug reziprok zum Gesamtöstrogen-Rezeptorgehalt ab.

Processing ist ein wichtiger Schritt zwischen dem Auftreten von nuklearen Hormon-Rezeptorkomplexen und der Synthese östrogenabhängiger Proteine. Es stellt nicht nur einen Mechanismus zur Beendigung der Wirkung von Östradiol-Nuklear-Rezeptoren dar, sondern führt unter ständigem Östradiol-Einfluß zu einem neuen steady state des Nuklear-Rezeptorgehalts. Es wird vermutet, daß diese ständige Stimulation für die Wirkung der Nuklear-Hormon-Rezeptorkomplexe am Genom notwendig ist (50).

Ebenso wie für den Östradiol-Rezeptor konnte beim Progesteron-Rezeptor nach einer Progesterongabe ein Processing nachgewiesen werden (38, 53, 80).

Wie dieses Processing zustande kommt, ob es ein neues Gleichgewicht zwischen Zerfall und de novo Synthese der Rezeptoren oder eine Affinitäts bzw. Spezifitätsänderung der Rezeptoren darstellt, ist noch nicht geklärt.

Der von uns in den verschiedenen Zyklusabschnitten gemessene Nuklear-Rezeptorgehalt des Endometriums stellt das Ergebnis aus de novo Synthese der cytoplasmatischen Rezeptoren, der Translokation nach Bindung mit Hormon in den Kern und dem Processing dieser Rezeptoren dar. Er wird wahrscheinlich weit unter dem Rezeptorgehalt in nicht stimulierten Zellen und unter der möglichen Syntheseleistung dieser Zellen liegen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, die bisher vorliegenden Erkenntnisse zur endokrinen Regulation des Endometriums während des mensuellen Zyklus durch die quantitative Bestimmung der nuklearen Rezeptoren für Östradiol und Progesteron zu erweitern.

Ein erstmals von Anderson et al für den Östradiol-Rezeptor des Rattenuterus beschriebener Nuklear-Rezeptorassay wurde leicht modifiziert, und der Östradiol- und Progesteron-Nuklear-Rezeptorgehalt von 28 eindeutig datierten Endometriumpuben bestimmt. Es zeigten sich folgende Veränderungen im Rezeptorgehalt:

1. Der Östradiol-Nuklear-Rezeptor folgt den für den cytoplasmatischen Rezeptor beschriebenen zyklischen Veränderungen mit einer zeitlichen Verzögerung. Die höchsten Konzentrationen werden in der späten proliferativen Phase gefunden. In der sekretorischen Phase sinken die Konzentrationen kontinuierlich ab und erreichen in der späten sekretorischen Phase die niedrigsten Werte des gesamten Zyklus.
2. Beim Progesteron-Nuklear-Rezeptor fand sich ein starker Anstieg von der frühen zur späten proliferativen Phase, während der die höchsten Konzentrationen gefunden wurden. In der sekretorischen Phase kommt es zu einem Abfall der Progesteron-Nuklear-Rezeptoren. Die geringsten Konzentrationen wurden wie beim Östradiol-Nuklear-Rezeptor in der späten sekretorischen Phase gefunden.

Der Abfall der cytoplasmatischen Rezeptoren führt zum Anstieg der Hormon-Rezeptorkomplexe im Kern, was sich indirekt durch die Zunahme der nuklearen Rezeptoren nachweisen läßt. Die festgestellten zyklischen Konzentrationsschwankungen im nuklearen Rezeptorgehalt des Human-Endometriums fügen sich in die diskutierten Regulationsmodelle der Veränderungen der Gebärmutter Schleimhaut im Zyklus ein.

1. In der frühen proliferativen Phase induziert Östradiol seinen eigenen Rezeptor.
2. Die cytoplasmatischen Rezeptoren binden Östrogen und werden als Hormon-Rezeptorkomplex in den Kern transloziert (Abnahme der cytoplasmatischen Rezeptoren und gleichzeitige Zunahme der nuklearen Rezeptoren von der frühen zur späten Proliferationsphase).

3. Der mittzyklische Östradiol-Peak im Endometrium führt via Rezeptormechanismus zur Synthese von Progesteron-Rezeptoren.
4. Unter dem präovulatorischen Anstieg des Progesteron-Gewebespiegels kommt es zur vermehrten Bildung von cytoplasmatischen Progesteron-Rezeptorkomplexen und der Translokation in den Nukleus (Anstieg der Progesteron-Nuklear-Rezeptoren in der späten Proliferationsphase).
5. Der Progesteronanstieg führt über den Hormon-Rezeptormechanismus zur Aktivitätszunahme der 17- β -HSD und dadurch zur vermehrten Umwandlung von Östradiol zu Östron im Endometrium. Die durch Östradiol bedingte de novo Synthese beider Rezeptoren verringert sich. (Abnahme der cytoplasmatischen Rezeptoren in der sekretorischen Phase)
6. Durch die Abnahme der cytoplasmatischen Rezeptoren vermindert sich die Aufnahme von Östradiol und Progesteron aus dem Blut.
7. Durch die Verringerung der cytoplasmatischen Rezeptoren, die Abnahme der Gewebekonzentration der Hormone und die vermehrte Umwandlung von Östradiol zu Östron nimmt die Translokation von Hormon-Rezeptorkomplexen in den Kern ab. Es kommt zu der beschriebenen Konzentrationsabnahme nuklearer Akzeptorstellen für Östradiol und Progesteron in der späten sekretorischen Phase.

6. BIBLIOGRAPHIE

1. Abraham, G.E.: Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 β . J.Clin.Endocrinol.Metab. 28:866, 1969.
2. Anderson, J.N., Clark, J.H., Peck, E.J.: The relationship between nuclear receptor-estrogen binding and uterotrophic responses. Res.Commun. 48:1460, 1972.
3. Astwood, E.B.: A six hour assay for the quantitative determination of estrogen. Endocrinology 23: 25, 1939.
4. Astwood, E.B.: Regulation of corpus luteum function by hypophysial luteotropin. Endocrinology 28: 309, 1941.
5. Batra, S., Benqtsson, L.P.: A highly efficient procedure for the extraction of progesterone from uterus and its compatibility with subsequent radioimmunoassay. J.Steroid.Biochem. 7: 599, 1976.
6. Baulieu, E.-E., Robel, P., Bayard, F., Gantray, J.P., DeBrux, J.: Sex steroid receptors in human endometrium. In 'Endometrial Cancer' (eds. Brush, M.G., King, R.J.B., Tayler, R.W.), Bailliere, London, 1977.
7. Bayard, F., Damilano, S., Robel, P., Baulieu, E.-E.: Récepteurs de l'œstradiol et de la progestérone dans l'endomètre humain au cours du cycle menstruel. Annales d'Endocrinologie 28: 1341, 1975.
8. Bayard, F., Damilano, S., Robel, P. and Baulieu, E.-E.: Cytoplasmic and nuclear estradiol and progesterone receptors in human endometrium. J.Clin.Endo.Metab. 46: 635, 1978.
9. Bayard, F., Keitman, B. and Derache, B.: Measurement of the progesterone receptor in human endometrium using progesterone and R 5020. In: Progesterone Receptors in Normal and Neoplastic Tissues. (McGuire, W.L., Baynaud, J.P. and Baulieu, E.-E. eds.), Raven Press, 1977.
10. Berenblum, I.: Carcinogenesis as a biological problem. American Elsevier Publishing Co Inc, New York, 1947.
11. Bogdanove, E.M., Nolin, J.M., Campbell, G.T.: Qualitative and quantitative gonad-pituitary feedback. Rec.Progr.Horm.Res. 31: 567, 1975.

12. Brown, J.B., Klopfer, A., Loraine, J.A.: The urinary excretion of estrogens, pregnandiol and gonadotropins during the menstrual cycle. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 17: 401, 1958.
13. Brush, M.G., Tayler, R.W., King, R.J.G.: The uptake of (6,7-3H) δ estradiol by the normal human female reproductive tract. *J.Endocr.* 39: 599, 1967.
14. Buller, D.W., O'Malley, B.W.: The biology and mechanism of steroid hormone receptor interaction with the eukaryotic nucleus. *Biochem. Pharmacol.* 25: 1, 1976.
15. Butenandt, A.: Über Progynon, ein kristallinisiertes weibliches Hormon. *Naturwissenschaften* 17: 979, 1929.
16. Butenandt, A., Westphal, K.: Zur Isolierung und Charakterisierung des Corpus-luteum- Hormones. *Ber.dtsch.chem.Ges.* 67: 1440, 1934.
17. Ceriotti, G.: Determination of nucleic acids in animal tissues. *J.Biol.Chem.* 214: 59, 1955.
18. Challis, J.R.G., Davis, I.J., Rayan, K.H.: The concentration of progesterone, estrone and estradiol-17 β in the myometrium of the pregnant rabbit and their relationship to the peripheral plasma steroid concentration. *Endocrinology* 95: 160, 1970.
19. Chamness, G.C., McGuire, W.L.: Estrogen receptors in the rat uterus: physiological forms and artifacts. *Biochemistry* 11: 2466, 1972.
20. Chan, L., O'Malley, B.W.: Mechanism of the sex steroid hormones. *N.Engl.J.Med* 294: 1322, 1976.
21. Clark, J.H., Hsueh, A.J.W., Peck, F.J., Jr.: Regulation of estrogen receptor replenishment by progesterone. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 286: 161, 1977.
22. Clauberg, C.: Der biologische Test für das Corpus-luteum Hormon. *Klin.Wschr.* 9: 2004, 1930.
23. Cousins, R.J., DeLuca, H.P., Suda, T., Chen, T. and Tanaka, Y.: Metabolism and subcellular location of 25-hydroxycholecalciferol in intestinal mucosa. *Biochemistry* 9: 1453, 1970.
24. Crocker, S.G., Milton, P.J.D., King, P.J.B.: Uptake of (6,7-3H) δ estradiol-17 β by normal and abnormal human endometrium. *J.Endocr.* 62: 145, 1974.

25. Czygan, P.-J.: Regulationsprinzip der weiblichen Keimdrüsenfunktion. Fortschr.Geb.Gynäk. 52: 121, 1974 (Karger, Basel).
26. Documenta Geigy: Wissenschaftliche Tabellen. Basel 1968.
27. Doisy, E.A., Veler, C.D., Thayer, S.: Folliculin from urine of pregnant woman. Amer.J.Physiol. 90: 329, 1929.
28. Eckert, R.L. und Katzenellenbogen, B.S.: Human Endometrium Cells in Primary Tissue Culture: Modulation of the Progesterone Receptor Level by Natural and Synthetic Estrogens in Vitro. J.Clin.Endocrin.Metab. 52:699, 1981.
29. Ehrlich, P.: Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. Ber.Dtsch.Chem.Ges. 42: 17, 1909.
30. Eriksson, H., Upchurch, S., Hardin, J.W., et al.: Heterogeneity of estrogen receptors in the cytosol and nuclear fraction of the rat uterus. Biochem.Biophys.Res.Comm. 81: 1, 1978.
31. Evans, L.H., Hähnel, R.: Distribution of estrogen receptor in cell fractions of human uterine tissue. J.Endocr. 56: 503, 1973.
32. Evans, L.H., Martin, J.D., Hähnel, R.: Estrogen receptor concentration in normal and pathological human uterine tissues. J.Clin.Endocrinol.Metab. 39: 23, 1974.
33. Evans, L.H., Hähnel, R.: Estrogen receptors in human uterine tissue. J.Endocr. 50: 209, 1971.
34. Feil, P.D., Glasser, S.R., Toft, D.O., O'Malley, B.W.: Progesterone binding in the mouse and rat uterus. Endocrinology 91: 738, 1972.
35. Feil, P.D. and Bardin, C.W.: Cytoplasmic and nuclear progesterone receptors in the guinea pig uterus. Endocrinology 97: 1398, 1975.
36. Fleming, H., Gurpide, E.: Available estradiol receptors in nuclei from human endometrium. 26th Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation, 1979 (Abstract 16).
37. Fränkel, L.: Das zeitliche Verhalten von Ovulation und Menstruation. Zbl.Gynäk. 35: 1591, 1911.

38. Preifeld, M.L., Feil, P.D., Bardin, C.W.: The in vivo regulation of progesterone 'receptors' in the guinea pig uterus. Dependence on estrogen and steroids. Steroids 23: 93, 1974.
39. Giannopoulos, G., Goldberg, P., Shea, T.B. and Tulchinsky, D.: Unoccupied and occupied estrogen receptors in myometrial cytosol and nuclei from nonpregnant and pregnant women. J.Clin.Endocrinol Metab 51: 702, 1980.
40. Glascock, R.P., Hökstra, W.G.: Selective accumulation of tritium-labelled hexöstrol by the reproductive organs of immature female goats and sheeps. Biochem.J 72: 673, 1959.
41. Gorski, J., Scarff, M., Clark, J.H.: The regulation of uterine concentration of estrogen binding protein. Adv.Biosc. 7: 5, 1971.
42. Gorski, J., Toft, D., Shymala, G., Smith, D.: Hormone receptors: studies on the interaction of estrogen with the uterus. Rec.Prog.Horm.Fes. 24: 45, 1968.
43. Hamilton, T.H.: Control by estrogen of genetic transcription and translation. Science 161: 649, 1968.
44. Harris, G.W.: The neural control of the pituitary gland. Arneold, London, 1955.
45. Haukkamaa, M., Luukkainen, T.: The cytoplasmic progesterone receptor of human endometrium during the cycle. J.Steroid.Biochem. 5: 447, 1974.
46. Henderson, S.R., Schalch, D.S.: Estrogen receptors in the human uterus. Am.J.Obstet.Gynecol. 112: 762, 1972.
47. Hitschmann, P., Adler, L.: Der Bau der Uterusschleimhaut des geschlechtsreifen Weibes mit besonderer Berücksichtigung der Menstruation. Mschr.Geburtsh.Gynäk. 27: 1, 1908.
48. Hnilica, L.S.: The structure and biological function of histones. Cleveland, CRC Press, 1972.
49. Hohlweg, W., Junkmann, K.: Die hormonal-nervöse Regulierung der Funktion des Hypophysenvorderlappens. Klin.Wschr. 11: 31, 1932.

50. Horwitz, K.B., McGuire, W.L.: Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer. Correlation with nuclear processing of estrogen receptors. *J.Biol.Chem* 253: 2233, 1978.
51. Hsueh, A.J.W., Peck, E.L., Clark, J.H.: Progesterone antagonism of the estrogen receptor and estrogen-induced uterine growth. *Nature* 254: 337, 1975.
52. Hunter, R.F., Jordan, V.C.: Detection of the 8 S estrogen-binding component in human uterine endometrium during the menstrual cycle. *J.Endocr.* 65: 457, 1975.
53. Isoma, V., Isotala, H., Orava, M., Jänne, O.: Regulation of cytosol and nuclear progesterone receptors in rabbit uterus by estrogen, antiestrogen and progesterone administration. *Biochim.Biophys.Acta* 585: 24, 1979.
54. Jänne, O., Kontula, K., Vihko, R.: Mechanism of action of female sex steroids. *Acta.Obstet.Gynecol.Scand.Suppl.* 51: 31, 1975.
55. Jänne, O., Kontula, K., Luukkainen, T., Vihko, R.: Estrogene induced progesterone receptor in human uterus. *J.Steroid Biochem.* 6: 501, 1975.
56. Jänne, O., Kontula, K. and Vihko, R.: Progestin receptors in human tissues: Concentrations and binding kinetics. *J.Steroid Biochem.* 7: 1061, 1976.
57. Jänne, O., Kauppila, A., Kontula, K., et al.: Female sex steroid receptors in normal, hyperplastic and carcinomatous endometrium. The relationship to serum steroid hormones and gonadotropins and changes during medroxyprogesterone acetate administration. *Int.J.Cancer* 24: 545, 1979.
58. Jensen, E.V., DeSombre, E.R., Jungblut, P.W.: Estrogen receptors in hormone-responsive tissues and tumors. In: *Endogenous Factors Influencing Host-Tumor Balance*, edit by R.W.Wissler, T.L. Dao and S.Wood, Jr., pp.15-30, University of Chicago Press, Chicago, 1967.
59. Jensen, E.V., Jacobsen, H.I.: Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Rec.Prog.Horm.Res.* 18: 387, 1962.

60. Johannsson, E.D.B.: Progesterone levels in peripheral plasma during the luteal phase of the normal human menstrual cycle measured by a rapid competitive protein binding technique. *Acta. Endocrinol. (Kbh)* 61: 592, 1969.
61. Katzenellenbogen, B.S.: Dynamics of steroid hormone receptor action. *Annu. Rev. Physiol.* 42: 17, 1980.
62. King, R.J.B., Jordan, J.: The localization of (6,7,3H) estradiol-17 β in the rat uterus. *J. Endocr.* 34: 431, 1966.
63. King, R.J.B.: Measurement of receptors for oestrogens and progestins as prognostic markers for response of abnormal endometria to progestin therapy. In: *Endometrial Cancer.* (M.G. Brush, R.J.B. King and R.W. Taylor, eds.), Bailliere, London, 1978.
64. King, R.J.B., Campbell, S., Whitehead, M.J., Minardi, J.: Biochemical studies on endometrium from postmenopausal women receiving hormone replacement therapy. *Postgraduate Med. J.* 54: 65, 1978.
65. Kontula, K., Jänne, C., Luukkainen, T., Vihko, R.: Progesterone-binding protein in human myometrium: ligand specificity and some physicochemical characteristics. *Biochem. Biophys. Acta* 328: 145, 1973.
66. Kontula, K., Jänne, C., Luukkainen, T., Vihko, R.: Progesterone-binding protein in human myometrium. Influence of metal ions on binding. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38: 500, 1974.
67. Kontula, K.: Progesterone-binding protein in human myometrium. Binding site concentration in relation to endogenous progesterone and estradiol-17 β levels. *J. Steroid. Biochem.* 4: 1555, 1976.
68. Korenman, S.G., O'Malley, B.W.: Progesterone action: regulation of avidin biosynthesis by hen oviduct in vivo and vitro. *Endocrinology* 83: 11, 1968.
69. Leydendecker, G., Nocke, W.: Die endokrine Regulation des menstruellen Zyklus. *Fortschr. Med.* 33: 1910, 1976.
70. Lian, T., Liao, S.: Interaction of estradiol- and progesterone-receptors with nucleoprotein. Heat-labile acceptor factors. *Biochim. Biophys. Acta* 277: 590, 1972.

71. Lianq, T., Lia, S.: Association of the uterine 17 β -estradiol-receptor complex with ribonucleoprotein in vitro and in vivo. *J.Biol.Chem.* 249: 4671, 1974.
72. Luu Thi, M.I., Baulieu, E.-E., Milgrom, E.: Comparison of the characteristics and of the hormonal control of endometrial and myometrial progesterone receptors. *J.Endocr.* 66: 349, 1975.
73. MacLaughlin, D.T., Richardson, G.S.: Progesterone binding by normal and abnormal endometrium. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 38: 628, 1976.
74. McGuire, W.L., Baulieu, E.-E.: Progesterone Receptors in normal and neoplastic tissues. Raven Press, New York, 1977.
75. Mester, I., Martel, D., Psychoyos, A., Baulieu, E.-E.: Hormonal control of estrogen receptor in uterus and respectivity for ovoidimplantation in the rat. *Nature* 250: 766, 1974.
76. Mester, J. and Baulieu, E.-E.: Dynamics of estrogen-receptor distribution between the cytosol and nuclear fractions of immature rat uterus after estrogene administration. *Biochem.J.* 146:617, 1975.
77. Mester, J., Robertson, D.M., Feherty, P., Kellie, A.E.: Determination of a high-affinity oestrogen receptor sites in uterine supernatant preparations. *Biochem.J.* 120: 531, 1970.
78. Meyer, R.: Lehre von der normalen und krankhaften Ovulation und der mit ihr in Beziehung gebrachten Vorgänge am Uterus. *Arch.Gynäk.* 37: 50, 1920.
79. Meyer, F., Ruqe, C.: Über Corpusluteum-Bildung und Menstruation in ihrer zeitlichen Zusammengehörigkeit. *Zbl.Gynäk.* 37: 50, 1913.
80. Milgrom, F., Thi, L., Atger, Baulieu, F.-E.: Mechanism regulating the concentration and confirmation of progesterone receptors in the uterus. *J.Biol.Chem.* 248: 6366, 1973.
81. Milgrom, E., Atger, M., Perrot, M., Baulieu, E.-E.: Progesterone in uterus and plasma. VI. Uterine progesterone receptors during the estrus cycle and implantation in the quinea pig. *Endocrinology* 90: 1071, 1972.
82. Mochler, E.K., Flickinger, G.L., Mangan, C.E., Mikhail, G.: Estradiol binding by human endometrial tissue. *Gynecol.Oncol.* 3: 244, 1975.

83. Noteboom, W.D., Gorski, J.: Stereospecific binding of estrogens in the rat uterus. *Arch.Biochem.Biophys.* 111: 559, 1965.
84. Notides, A.C., Hamilton, D.E., and Rudolph, J.H.: Estrogen binding proteins of the human uterus. *Biochem.Biophys.Acta* 271: 351, 1972.
85. Moyes, R.W., Hartiq, A.T., Rock, J.: Dating the endometrial biopsy. *Fertil.Steril.* 1: 3, 1950.
86. O'Malley, B.W., Schrader, W.T.: The receptors of steroid hormones. *Scientific Americ* 234: 32, 1976.
87. O'Malley, B.W., Spelsberg, T.C., Schrader, W.T., Chytil, P., Steqqles, A.W.: Mechanisms of interaction of a hormone-receptor complex with the genome of a eukaryotic target cell. *Nature Lond.* 235: 141, 1972.
88. O'Malley, B.W.: In vitro hormonal induction of a specific protein (avidin) in chick oviduct. *Biochemistry* 6: 1546, 1967.
89. Philibert, D., Raynaud, J.P.: Binding of progesterone and P 5020, a highly potent progestin, to human endometrium an myometrium. *Contraception* 10: 457, 1974.
90. Pollow, K., Boquoi, E., Schmidt-Gollwitzer, M., Pollow, B.: The nuclear estradiol and progesterone receptors of human endometrium and endometrial carcinoma. *J.Mol.Med.* 1: 325, 1976.
91. Pollow, K., Heßlinger, H., Schmidt-Gollwitzer, M., Pollow, B.: Nuclear non-histone chromosomal proteins (NHCP) from human endometrial tissue during the menstrual cycle. In 'Endometrial Cancer' (eds. Brush, M.G., King, E.J.B., Tayler, R.W.), Bailliere, London, 1977.
92. Pollow, K., Lübbert, H., Boquoi, E., Kreuzer, G., Jeske, R., Pollow, B.: Characterisation and comparison of receptors for 17 β -estradiol and progesterone in human proliferative endometrium and endometrial carcinoma. *Endocrinology* 96: 319, 1975.
93. Pollow, K., Schmidt-Gollwitzer, M., Nevinny-Stickel, J.: Progesterone receptors in normal human endometrium an endometrial carcinoma. In 'Progesterone receptors in normal and neoplastic tissues' (eds. McGuire, W.L., Raynaud, J.P., Baulieu, E.-E.), p313, Raven Press, New York, 1977.

94. Pollow, K., Schmidt-Gollwitzer, M. and Pollow, B.: Progesterone- and estradiol-binding proteins from normal human endometrium and endometrial carcinoma: a comparative study. In 'Steroid Receptors and Hormone Dependent Neoplasia. (eds. Wittliff, J.L. and Dapunt, O.), Innsbruck, 1978.
95. Puca, G.A., Nola, E., Sica, V., Bresciani, F.: Estrogen-binding proteins of calf uterus. Interrelationship between various forms and identification of a receptortransforming factor. *Biochemistry* 11: 4157, 1972.
96. Pao, B.F., Wiest, W.G., Allen, W.M.: Progesterone ' receptors ' in human endometrium. *Endocrinology* 95: 1275, 1974.
97. Richardson, G.S., MacLaughlin, D.T.: Receptors for steroids in human endometrium. In 'Hormonal Biology of Endometrial Cancer', UICC Technical Report Series 42: 63, 1978.
98. Pobel, P., Bayard, P., Gauntay, J.P., De Brux, J., Wolff, J.P., Baulieu, E.-E.: Estradiol and progesterone receptors in normal and abnormal human endometrium. International Study Groups for Steroid Hormones, Rome, 1977. In 'Research on Steroids 8 ' 1978.
99. Rodriguez, J., Sen, K.K., Seski, J.C., Menon, M., Johnson, T.R., Menon, K.M.J.: Progesterone binding by human endometrial tissue during the proliferative and secretory phase of the menstrual cycle and by hyperplastic and carcinomatous endometrium. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 133: 660, 1979.
100. Robertson, D.M., Mester, J., Beilby, J., Steele, S.J., and Kellie, A.E.: The measurement of high affinity estradiol receptors in human uterine endometrium and myometrium. *Acta Endocrinol. (Kbh)* 68: 534, 1971.
101. Rösner, J.M., Martinez, I.M., Menfizihal, A.F., Speltro, A.: The in vivo and in vitro uptake of labeled estradiol by different segments of the human uterus. *Steroidologia* 2: 283, 1971.
102. Sakiz, E., Azadian-Boulanger, G., Laraque, F., and Raynaud, J.P.: A new approach to estrogenfree contraception based on progesterone receptor blockade by mid-cycle administration of ethyl norgestrienone (R 2323). *Contraception* 19: 467, 1974.

103. Sandborn, B.M., Held, B. and Kuo, H.S.: Specific estrogen binding proteins in human cervix. *J.Ster.Biochem.* 6: 1107, 1975.
104. Scatchard, G.: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 51: 660, 1949.
105. Schally, A.V., Arimura, A., Baba, Y., Nair, R.M.G., Matsuo, H., Redding, T.W., Debeljuk, L.: Isolation and properties of PSH- and LH-releasing hormone. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 43: 393, 1971.
106. Schally, A.V., Arimura, A., Bowers, C.Y., Sawano, S., Redding, T.V.: Hypothalamic neurohormones regulating anterior pituitary functions. *Rec.Prog.Horm.Res.* 24: 497, 1968.
107. Schmidt-Gollwitzer, M., Eiletz, J., Genz, T., Pollow, K.: Correlation of serum and tissue concentrations of estrone, estradiol and progesterone to the estradiol and progesterone receptor content and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in human myometrium during the menstrual cycle. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 49:370, 1979.
108. Schmidt-Gollwitzer, M., Müller, E., Metscher, B., Nevinny-Stickel, J.: Serum concentrations of gonadotropin releasing hormone (Gn-RH), gonadotropins and steroids during the menstrual cycle. Development of radioimmunoassay for Gn-RH. Symposium of the International Society of Psychoendocrinology, Visegrad, 1975. In 'Cellular and Molecular Bases of Neuroendocrine Processes', (eds. Endröczy, Z.), p.123, Academic Kiado, Budapest, 1976.
109. Schrader, W.T., Heuer, S.S., O'Malley, B.W.: Progesterone receptors of chick oviduct. Identification of 6S receptor dimers. *Biol.Reprod.* 12: 134, 1975.
110. Schröder, R.: Der normale menstruelle Zyklus der Uterusschleimhaut. Hirschwald, Berlin 1913.
111. Schröder, R.: Über die zeitliche Beziehung der Ovulation und Menstruation. *Arch.Gynäk.* 101: 1, 1914.
112. Schröder, R.: Anatomische Studien zur normalen und pathologischen Physiologie des Menstruationszyklus. *Arch.Gynäk.* 104: 127, 1915.
113. Schröder, R.: Der menstruelle Genitalzyklus und seine Anomalien. *Mtschr.Geburtsh.Gynäk.* 58: 183, 1921.

114. Schröder, R.: Der menstruelle Genitalzyklus des Weibes und seine Störungen. In ' Hdb. Der Gynäkologie, Bd.I/2, Hsq. Stöckel, W.J.F., Bergmann, München 1928.
115. Shymala, G.: Is the estrogen receptor of mammary glands a metallo protein. Biochem.Biophys.Res.Comm. 64: 408, 1975.
116. Sica, V., Nola, E., Parikh, I., Puca, G.A., Cuatrecasas, P.: Purification of estradiol receptor by affinity chromatography. Nature New Biology 244: 36, 1973.
117. Smith, R.G., Iramain, C.A., Buttram, V.C., O'Malley, B.W.: Purification of human uterine progesterone receptor. Nature 253: 271, 1975.
118. Spelsberg, T.C., Steggle, A.W., O'Malley, B.W.: Progesterone-binding components of chick oviduct. II.Chromatin acceptor sites. J.Biol.Chem. 246: 4188, 1971.
119. Spelsberg, T.C., Steggle, A.W., Chytil, F., O'Malley, B.W.: Progesterone binding components of chick oviduct. V.Exchange of progesterone binding capacity from target to nontarget tissue chromatin. J.Biol.Chem. 247: 1368, 1972.
120. Stein, G.S., Spelsberg, T.C., Kleinsmith, L.J.: Nonhistone chromosomal proteins and gene regulation. Science 183: 817, 1974.
121. Sutherland, R.L., Baulieu, E.-F.: Quantitative estimates of cytoplasmic and nuclear oestrogen receptors in chick oviduct. Effect of estrogen on receptor concentration and subcellular distribution. Eur.J.Biochem. 70: 531, 1976.
122. Toft, D., Gorski, J.: A receptor molecule for estrogen: its isolation and preliminary characterization. J.Cell.Biol. 27: 107A, 1965.
123. Traeger, C.: Steroidhormone. Springer Verlag, Berlin, 1977.
124. Trams, S., Engel, B., Lehmann, F., Maass, H.: Specific binding of estradiol in human uterine tissue. Acta Endocrinol.(Kbh) 72:351, 1973.
125. Tsenq, L., Gurpide, F.: Nuclear concentration of estradiol in superfused slices of human endometrium. Am.J.Obstet.Gynecol. 114: 995, 1972.

126. Tsenq, L., Gurside, E.: Effects of progestins on estradiol receptor levels in human endometrium. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 41: 402, 1975.
127. Tsenq, L. und Gurside, E.: Effects of progestins on estradiol receptor levels in human endometrium. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 41:402, 1975.
128. Tsenq, L., Gurside, E.: Effect of estrone and progesterone on nuclear uptake of estradiol by slices of human endometrium. *Endocrinology* 93: 245, 1973.
129. Tsenq, L., Stolee, A., Gurside, E.: Quantitative studies on the uptake and metabolism of estrogens and progesterone by human endometrium. *Endocrinology* 90: 390, 1972.
130. Verma, U., Laumas, K.P.: In vitro binding of progesterone to receptors in the human endometrium and the myometrium. *Biochem.Biophys.Acta* 317: 403, 1973.
131. Verhage, H.G., Akbar, M., Jaffe, R.C.: Cyclic changes in the cytosol progesterone receptor of human fallopian tube. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 51: 776, 1980.
132. Wagner, R.K.: Receptor assay in human target tissues. A critical assessment. *Acta Endocrinol.(Kbh) Suppl.* 193: 158, 1975.
133. Wiele wande, R.L., Boquil, L., Dyrenfurth, J., Ferine, M., Jewelewicz, R., Warren, M., Bizkallah, T., Mikhail, G.: Mechanism regulating the menstrual cycle in women. *Rec.Progr.Horm.Res.* 26: 63, 1970.
134. Whitehead, M.I., Townsend, P.T., Pryse-Davies, J., Path, P.R.C., Ryder, T.A., King, R.J.R.: Effects of estrogens and progestins on the biochemistry and morphology of the postmenopausal endometrium. *N.Engl.J.Med.* 305: 1599, 1981.
135. Woolever, C.A.: Daily plasma progesterone levels during the menstrual cycle. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 85: 981, 1963.
136. Wyss, P.H., Le Roy-Heinrich, W., Herrmann, W.L.: Some species differences of uterine estradiol receptors. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 28: 1227, 1968.

137. Young, P.C.M., Cleary, R.E.: Characterize and properties of progesterone binding components in human endometrium. J.Clin.Endocrinol.Metab. 39: 425, 1974.

L E B E N S L A U F

Am 9.10.1957 wurde ich, Ernst Thomas Scheiber als Kind von Dr. phil. Hans-Ernst Scheiber, Chemiker, geb. am 6.12.07 in Leipzig, gestorben am 3.12.75 in Bremen und seiner Ehefrau Gertraud Scheiber, geb. Roux, Chemotechnikerin, geb. am 25.2.20 in Leipzig in Bremen geboren.

Von 1964 bis 1967 besuchte ich in Bremen-Huchting die Grundschule, wechselte im Herbst 1967 auf das Gymnasium am Leibniz Platz über, daß ich bis zur 10. Klasse besuchte. Die Oberstufe besuchte ich vom Herbst 1973 bis Frühjahr 1976 auf dem Gymnasium Huckelriede in Bremen, wo ich den Naturwissenschaftlichen Zweig belegte und am 10.5.1976 das Abitur bestand.

Vom 1.7.76 bis zum 20.3.77 leistete ich Wehrdienst, wurde aufgrund der Studienzulassung zum Medizinstudium vorzeitig entlassen und nahm im Sommer-Semester 77 das Medizinstudium an der Freien Universität Berlin auf.

Das Physikum legte ich am 20.3.79 in Berlin ab. Am 20.3.80 bestand ich den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung and am 2.4.82 den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

Das Praktische Jahr habe ich am 20.3.82 mit dem Teil Chirurgie im Krankenhaus Moabit begonnen, wo ich auch den Teil Innere Medizin ableistete. Als Wahlfach belegte ich Gynäkologie in der Frauenklinik und Poliklinik Charlottenburg, Klinikum Charlottenburg. Den schriftlichen Teil des 3. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung habe ich am 7.4.83 abgelegt und mit dem mündlichen Teil des 3. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung am 17.5.83 das Staatsexamen bestanden.

Die Approbation als Arzt erhielt ich am 31.5.1983.

D A N K S A G U N G

Herrn Prof. Dr. J. Nevinny-Stickel, der immer persönliches Interesse am Fortgang der Arbeit zeigte, bin ich für die histologische Datierung der Gewebe dankbar.

Herrn Dr. J. Eiletz möchte ich herzlich für seine freundschaftliche Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit danken.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Dipl.-Phys. J. Pachaly für die stets geduldige Hilfe bei der Benutzung der EDV-Anlage.

Den Assistentinnen des Hormonlabors sei für die freundliche Hilfe bei der Arbeit im Labor gedankt.

Für die Anfertigung der fotografischen Reproduktionen gilt mein Dank der Grafik-Foto-Abteilung des Klinikums Charlottenburg.

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Priv. Doz. Dr. M. Schmidt-Gollwitzer für die Stellung des Themas, die vielen Anregungen und die stete Unterstützung, die wesentlich zum Fortschreiten und Abschluß der Arbeit beigetragen hat, verpflichtet.

